

**Entwicklung eines bioaktiven Gelenknorpelimplantates auf der  
Basis von bakterieller Nanocellulose (BNC)  
- *In vitro*-Untersuchungen in einem bovinen  
Knorpelregenerationsmodell -**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von  
Stefanie Linß  
geboren am 17.10.1986 in Eisenach

#### Gutachter

1. Prof. Dr. med. R. W. Kinne, AG Experimentelle Rheumatologie, Lehrstuhl für Orthopädie, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. Rolf Bräuer, AG Immunpathologie, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. rer. nat. Michael Sittinger, Labor für Tissue Engineering, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie (CCM), Humboldt-Universität Berlin

Tag der öffentlichen Verteidigung: 31.07.2012

# I ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
<i>A. (bi)dest.</i>	(zweifach) destilliertes Wasser
ACT	autologe Chondrozytentransplantation
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AG	Antigen
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
bp	Basenpaare
BM-MSC	engl. <i>bone marrow-derived mesenchymal stem cells</i>
BMI	engl. <i>Body-Mass-Index</i>
BMP	engl. <i>bone morphogenetic protein</i>
BNC	bakterielle Nanocellulose
BNS	boviner nasaler Septumknorpel
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i>
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COMP	engl. <i>cartilage oligomeric matrix protein</i>
CRP	C-reaktives Protein
CS	Chondroitinsulfat
DAB	Diaminobenzidin
DAP	1,2-Diaminophenazin
DMB	Dimethylenblau
DMEM/F12	engl. <i>Dulbecco's modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DS	Dermatansulfat

DTAF	Dichlorotriazinylaminofluorescein
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i>
FG	Knorpelfeuchtgewicht
FGF-2	engl. <i>fibroblast growth factor 2</i>
FSC	engl. <i>forward scatter</i>
FSU	Friedrich-Schiller-Universität
g	Erdbeschleunigung
GAG	Glykosaminoglykane
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IGF-1	engl. <i>insulin-like growth factor 1</i>
IL-1	Interleukin-1
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
Koll1, 2, ..., 10	Kollagen Typ I, II, ..., X
KS	Keratansulfat

MACT	Matrix-gekoppelte autologe Chondrozytentransplantation
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPZ	mesenchymale Progenitorzellen
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
MSZ	mesenchymale Stammzellen
MW	Mittelwert
MWCO	engl. <i>molecular weight cut off</i>
NaOH	Natriumhydroxid
OA	Osteoarthrose
OATS	osteochondrales autologes Transplantationssystem
OPD	<i>ortho</i> -Phenylendiamin
PBS	engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PBS-T	PBS mit 0,05% Tween-20
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	engl. <i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	<i>para</i> -Formaldehyd
PG	Proteoglykan(e)
PGA	Polyglycolid
PLGA	Polylactid-co-glycolid
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat
POD	Peroxidase
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	engl. <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR

SEM	engl. <i>standard error of the mean</i>
SSC	engl. <i>sideward scatter</i>
Tab.	Tabelle
TBS	engl. <i>Tris-buffered saline</i>
TE	engl. <i>tissue engineering</i>
TEP	Totalendoprothese
TGF- $\beta$ 1	engl. <i>transforming growth factor beta 1</i>
TGF- $\beta$ RII	TGF- $\beta$ -Rezeptor II
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminoethan
U	engl. <i>units</i>
ü. N.	über Nacht

### ***Verwendete SI-Einheiten***

°C	Grad Celsius	m	Meter
d	Tag	min	Minute
g	Gramm	M (mol/l)	molar
h	Stunde	s	Sekunde
l	Liter		

### ***Verwendete Präfixe***

c	zenti	m	milli
k	kilo	n	nano
$\mu$	mikro	p	piko

## II ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

	Seite
<b>Abbildung 1:</b>	Schematische Darstellung eines Aggrekanaggregates. 5
<b>Abbildung 2:</b>	Schematische Darstellung des Knorpelaufbaus zur Veranschaulichung der zonalen Gliederung und der Chondrozytenarchitektur (A) sowie der Fibrillenformation des Kollagens (B). 6
<b>Abbildung 3:</b>	Klassifizierung von Knorpeldefekten. 8
<b>Abbildung 4:</b>	Prinzip der ACT. 13
<b>Abbildung 5:</b>	Flächiges Hydrogel aus bakterieller Nanocellulose während statischer Kultivierung (A) bzw. nach Aufreinigung (B). 16
<b>Abbildung 6:</b>	Klinische Anwendungsbereiche bakterieller Nanocellulose. 16
<b>Abbildung 7:</b>	Präparation humanen Knorpelmaterials. 27
<b>Abbildung 8:</b>	Chondrozyten-Monolayerkultur. 28
<b>Abbildung 9:</b>	Präparation der Knorpelstanzen aus einem bovinen Kniegelenk. 29
<b>Abbildung 10:</b>	Plattenherstellung und Einbettung der Knorpel-BNC-Konstrukte. 31
<b>Abbildung 11:</b>	Vereinfachtes Testprinzip eines Sandwich-ELISA (A) bzw. eines kompetitiven ELISA mit Festphasenanalyt (B) mit den zugehörigen Kalibrierungskurven. 41
<b>Abbildung 12:</b>	Graphische Darstellung des Prinzips von Chemotaxis-Assays. 47
<b>Abbildung 13:</b>	Reaktionsmuster der Chondrozyten auf die initiale Defektsetzung. 51
<b>Abbildung 14:</b>	Lichtmikroskopische Darstellung der Knorpeloberfläche nach Kultur im Regenerationsmodell. 52
<b>Abbildung 15:</b>	Semiquantitative Analyse von Knorpelerosion und BNC-Besiedlung. 53
<b>Abbildung 16:</b>	Zusammenhang zwischen Knorpelintegrität und Migrationsverhalten der Chondrozyten nach <i>In vitro</i> -Kultur mit (A) und ohne TGF- $\beta$ 1 (B-D). 53
<b>Abbildung 17:</b>	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung verschiedener Knorpeloberflächen. 54
<b>Abbildung 18:</b>	REM-Aufnahmen eines chondrozytenbesiedelten BNC-Inserts nach 8-wöchiger Kultur und Entnahme aus der Knorpelscheibe. 55
<b>Abbildung 19:</b>	Netzwerk der Nanocellulose-Fasern im Vergleich zu den Kollagen-Fasern des natürlichen Gelenkknorpels. 56
<b>Abbildung 20:</b>	Lichtmikroskopische Darstellung des Netto-PG-Gehaltes im Knorpel. 57
<b>Abbildung 21:</b>	Quantitative Analyse des GAG-Gehaltes im Knorpel (A) bzw. der kumulativen GAG-Freisetzung in den Überstand (B) mittels DMB-Assay. 58
<b>Abbildung 22:</b>	„Cartilage flow-Phänomen“. 59
<b>Abbildung 23:</b>	Immunhistochemische Darstellung von intaktem neugebildeten Aggrekan in Knorpel und BNC. 60
<b>Abbildung 24:</b>	Quantitative Analyse des CS846-Gehaltes im Knorpel (A) bzw. der kumulativen CS846-Freisetzung in den Mediumüberstand (B). 61
<b>Abbildung 25:</b>	Aggrekan-mRNA-Expression in knorpelständigen (A) sowie in mobilisierten Chondrozyten auf der Knorpelaußenseite (B) bzw. auf der BNC (C). 63
<b>Abbildung 26:</b>	Immunhistochemische Darstellung von COMP in Knorpel und BNC. 64
<b>Abbildung 27:</b>	Quantitative Analyse der kumulativen COMP-Freisetzung in den Mediumüberstand. 65
<b>Abbildung 28:</b>	Immunhistochemische Darstellung von Kol2 in Knorpel und BNC. 66

<b>Abbildung 29:</b>	Quantitative Analyse des Kol2-Nettogehtes im Knorpel (A) bzw. der kumulativen Freisetzung von Kol2 in den Mediumüberstand (B).	67
<b>Abbildung 30:</b>	Kol2-mRNA-Expression in knorpelständigen (A) sowie in mobilisierten Chondrozyten auf der Knorpelaußenseite (B) bzw. auf der BNC (C).	68
<b>Abbildung 31:</b>	Quantitative Analyse des CPII-Nettogehtes im Knorpel (A) bzw. der kumulativen Freisetzung von CPII in den Mediumüberstand (B).	69
<b>Abbildung 32:</b>	Quantitative Analyse des C12C-Gehaltes im Knorpel.	70
<b>Abbildung 33:</b>	Immunhistochemische Darstellung von Kol1 in Knorpel und BNC.	71
<b>Abbildung 34:</b>	Kol1-mRNA-Expression in knorpelständigen (A) sowie in mobilisierten Chondrozyten auf der Knorpelaußenseite (B) bzw. auf der BNC (C).	72
<b>Abbildung 35:</b>	Expression des TGF- $\beta$ -Rezeptors II auf humanen und bovinen Chondrozyten.	73
<b>Abbildung 36:</b>	BrdU-Proliferationsassay nach 48-stündiger TGF- $\beta$ 1-Stimulation boviner Chondrozyten.	74
<b>Abbildung 37:</b>	BrdU-Proliferationsassay nach 48-stündiger TGF- $\beta$ 1-Stimulation humaner Chondrozyten.	75
<b>Abbildung 38:</b>	Rekrutierung boviner Chondrozyten unter TGF- $\beta$ 1-Stimulation.	76
<b>Abbildung 39:</b>	Rekrutierung humaner Chondrozyten unter Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 (A) bzw. allogenem Serum (B).	76
<b>Abbildung 40:</b>	Besiedlung von mit Gelatine-Porogenen modifizierter Cellulose mit humanen Chondrozyten nach 24 h Kultivierungsdauer.	77
<b>Abbildung 41:</b>	Kanalstrukturen eindimensional gelasierter BNC-Implantate nach Chondrozytenbesiedlung und 24 h statischer Kultur.	78
<b>Abbildung 42:</b>	Histologische Schnittpräparate eines dreidimensional gelaserten BNC-Implantates nach Chondrozytenbesiedlung und 24 h dynamischer <i>In vitro</i> -Kultur.	79
<b>Abbildung 43:</b>	Laserscanningmikroskopische Aufnahme eines dreidimensional gelaserten BNC-Implantates nach Chondrozytenbesiedlung und 24 h dynamischer <i>In vitro</i> -Kultur (Aufsicht).	79
<b>Abbildung 44:</b>	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines dreidimensional gelaserten BNC-Implantates nach Chondrozytenbesiedlung und 24 h dynamischer <i>In vitro</i> -Kultur.	80
<b>Abbildung 45:</b>	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen Laser-modifizierter BNC-Implantate nach Chondrozytenbesiedlung und 7 d <i>In vitro</i> -Kultur.	80
<b>Abbildung 46:</b>	Wöchentliche Einzelfreisetzungen relevanter Matrixmarker in den Mediumüberstand.	II
<b>Abbildung 47:</b>	Quantitative Analyse des endogenen TGF- $\beta$ 1-Gehaltes im Knorpel.	II
<b>Tabelle 1:</b>	Übersicht über die für die immunhistochemischen Darstellungen verwendeten Primär-/Sekundär-AK/Substrat-Kombinationen mit den zugehörigen Isotypkontrollen.	33
<b>Tabelle 2:</b>	Detaillierte Herstellerprotokolle für den CPII-, C12C- und hCOMP-ELISA.	42
<b>Tabelle 3:</b>	Klinische und radiologische Daten der humanen Gewebespenden für die Chondrozytenisolation.	I
<b>Tabelle 4:</b>	Ausführliche Liste der verwendeten Bedingungen und Primersequenzen für die „real-time“-RT-PCR der bovinen Gene.	I



### III INHALTSVERZEICHNIS

<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>i</b>
<b>II</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>III</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
2.1	Aufbau und Bestandteile des hyalinen Gelenkknorpels	3
2.2	Pathogenese und Regenerationsmechanismen von Knorpeldefekten	7
2.2.1	Traumatische Knorpelschäden	7
2.2.2	Degenerative Knorpelschäden	9
2.3	Etablierte Therapiekonzepte bei Gelenkknorpeldefekten	10
2.3.1	Lavage, Shaving und Débridement	10
2.3.2	Abrasio und Mikrofrakturierung	11
2.3.3	Osteochondrale Transplantation	12
2.3.4	Autologe Chondrozytentransplantation	12
2.4	Innovative Forschungsansätze hinsichtlich endogener Knorpelregeneration	14
2.4.1	Bakterielle Nanocellulose als bioaktives Knorpelimplantat	15
2.4.2	Einsatz von TGF- $\beta$ als bioaktiver Faktor	17
2.4.3	Mesenchymale Progenitorzellen im Knorpel	18
<b>3</b>	<b>PROBLEMSTELLUNGEN UND ZIELE DER ARBEIT</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
4.1	Ausführliche Liste der verwendeten Geräte	21
4.2	Ausführliche Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmittel	22
4.3	Ausführliche Liste der verwendeten Medien und Lösungen	25
4.4	Knorpelgewinnung zur Chondrozytenisolierung	26
4.4.1	Präparation bovinen Knorpelmaterials	26

4.4.2	Präparation humanen Knorpelmaterials	26
4.4.3	Isolierung und Kultivierung boviner und humaner Chondrozyten	27
<b>4.5</b>	<b>Etablierung des <i>In vitro</i>-Regenerationsassays mit bakterieller Nanocellulose</b>	<b>29</b>
4.5.1	Gewinnung boviner Knorpelstanzen	29
4.5.2	Plattenherstellung	30
4.5.3	<i>In vitro</i> -Kultivierung	30
<b>4.6</b>	<b>Histologische Analysen</b>	<b>31</b>
4.6.1	Aufbereitung der Knorpel-BNC-Konstrukte für histologische und immunhistochemische Analysen	31
4.6.2	Histologische Färbungen	32
4.6.3	Immunhistochemische Färbungen	32
4.6.4	Aufbereitung der Knorpel-BNC-Konstrukte für rasterelektronenmikroskopische Analysen	34
<b>4.7</b>	<b>Molekularbiologische Analysen</b>	<b>34</b>
4.7.1	Aufbereitung der Knorpel-BNC-Konstrukte für molekularbiologische Analysen	34
4.7.2	RNA-Isolierung	35
4.7.2.1	RNA-Isolierung aus den auf der Knorpelaußenseite bzw. auf der BNC befindlichen Chondrozyten	35
4.7.2.2	RNA-Isolierung aus knorpelständigen Chondrozyten	36
4.7.3	Synthese von cDNA mittels reverser Transkriptase	36
4.7.4	Analyse der Genexpression mittels „real-time“-RT-PCR	37
<b>4.8</b>	<b>Biochemische Analysen</b>	<b>38</b>
4.8.1	Proteinextraktion aus dem Knorpel	38
4.8.2	GAG-Bestimmung mittels DMB-Assay	39
4.8.3	Bestimmung der Proteinexpression mittels ELISA	40
4.8.3.1	Bestimmung von Kollagenfragmenten (CPII, C12C) und COMP	40
4.8.3.2	Bestimmung von Aggrekanfragmenten (CS846)	42
4.8.3.3	Bestimmung des Gesamt-Kollagen-Typ II-Gehaltes	43
<b>4.9</b>	<b>Untersuchungen zum Wirkprofil von TGF-<math>\beta</math>1 im angewandten Modell</b>	<b>44</b>
4.9.1	Durchflusszytometrische Analyse der Expression des TGF- $\beta$ -Rezeptors II auf bovinen und humanen Chondrozyten	44

4.9.2	TGF- $\beta$ 1-BrdU-Proliferationsassay boviner und humaner Chondrozyten	45
4.9.3	TGF- $\beta$ 1-Chemotaxisassay boviner und humaner Chondrozyten	47
4.9.4	TGF- $\beta$ 1-ELISA	48
<b>4.10</b>	<b>Zellbesiedlung verschiedener Typen modifizierter BNC</b>	<b>49</b>
<b>4.11</b>	<b>Graphische Darstellung und statistische Auswertung</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b><i>In vitro</i>-Regenerationsassay</b>	<b>51</b>
5.1.1	Lichtmikroskopische Darstellung der kultivierten Knorpel-BNC-Konstrukte	51
5.1.2	Morphologie der Knorpel-BNC-Regenerate im REM	54
5.1.3	Einfluss der Kulturbedingungen auf Matrixstoffwechsel und -regeneration	56
5.1.3.1	Proteoglykane	56
5.1.3.1.1	Gesamt-Proteoglykane	56
5.1.3.1.2	Aggrekan	59
5.1.3.2	COMP	63
5.1.3.3	Kollagen Typ II	65
5.1.3.4	Kollagen Typ I	71
<b>5.2</b>	<b>Untersuchungen zum Wirkprofil von TGF-<math>\beta</math>1 im angewandten Modell</b>	<b>73</b>
5.2.1	Expression des TGF- $\beta$ -Rezeptors II auf humanen und bovinen Chondrozyten	73
5.2.2	Proliferation isolierter Chondrozyten unter TGF- $\beta$ 1-Stimulation	74
5.2.2.1	Bovine Chondrozyten	74
5.2.2.2	Humane Chondrozyten	74
5.2.3	Chemotaxis isolierter Chondrozyten unter TGF- $\beta$ 1-Stimulation	75
5.2.3.1	Bovine Chondrozyten	75
5.2.3.2	Humane Chondrozyten	75
5.2.4	Eigengehalt von TGF- $\beta$ 1 in fetal-bovinem und humanem Serum	76
<b>5.3</b>	<b>Zellbesiedlung verschiedener Typen modifizierter BNC</b>	<b>77</b>
5.3.1	Porogen-modifizierte BNC	77
5.3.2	Laser-modifizierte BNC	78

<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>81</b>
<b>6.1</b>	<b><i>In vitro</i>-Knorpelregenerationsmodell</b>	<b>81</b>
6.1.1	Vorteile des entwickelten <i>In vitro</i> -Knorpelregenerationsmodells	81
6.1.2	Wahl der Versuchsbedingungen	83
6.1.3	Mobilisierung knorpelständiger Chondrozyten	85
6.1.4	Proteoglykane	87
6.1.5	COMP	92
6.1.6	Kollagene	94
<b>6.2</b>	<b>Relative Bedeutung von TGF-<math>\beta</math>1 im <i>In vitro</i>-Regenerationsmodell</b>	<b>99</b>
6.2.1	Knorpelintegrität	100
6.2.2	Matrixsynthese	100
6.2.3	Chondrozytenproliferation	103
6.2.4	Chondrozytenrekrutierung	105
<b>6.3</b>	<b>BNC als potentiell zellfreies Knorpelimplantat</b>	<b>107</b>
6.3.1	Zellbesiedlung nativer (unmodifizierter) BNC	107
6.3.2	<i>In vitro</i> -Integration	109
6.3.3	Zellbesiedlung modifizierter BNC	110
<b>6.4</b>	<b>Beitrag knorpelständiger MPZ zur endogenen <i>In situ</i>-Regeneration von Gelenkknorpel</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK</b>	<b>114</b>
	<b>LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS</b>	<b>116</b>
	<b>ANHANG</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Hyaliner Gelenkknorpel besitzt aufgrund seiner Avaskularität und relativ geringen Zellularität ein nur begrenztes Selbstheilungspotential. Trotz der erreichten Fortschritte in der Versorgung von traumatischen Verletzungen existiert bis heute kein universell erfolgreiches Therapiekonzept zur Behandlung substantieller Knorpeldefekte, das langfristig zufriedenstellende Ergebnisse bezüglich der Neosynthese vollwertig belastbaren Regenerationsgewebes aufweist.

Die AG „Experimentelle Rheumatologie“ der Friedrich-Schiller-Universität Jena beschäftigt sich daher mit der Entwicklung eines zellfreien, nicht resorbierbaren Gelenkknorpelersatzes auf der Basis von bakterieller Nanocellulose (BNC). Gebundene bioaktive Faktoren sollen dabei ortsständige Knorpelzellen in das Implantat rekrutieren und *in situ* zur Bildung und Integration von adäquatem Reparaturgewebe anregen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines standardisierten *In vitro*-Modells zur endogenen Knorpelregeneration, das die Langzeitkultur von Knorpelgewebe unter Vermeidung dedifferenzierender bzw. degradierender Gewebsprozesse ermöglicht. Mithilfe dieses Modells sollte die prinzipielle Eignung nativer BNC als potentiell zellfreies Knorpelimplantat untersucht werden. Gleichzeitig galt es, den konzeptionellen Beitrag des Wachstumsfaktors *Transforming Growth Factor beta 1* (TGF- $\beta$ 1) hinsichtlich *In vitro*-Rekrutierung, -Proliferation und -Matrixsynthese der knorpelständigen Zellen im Modell zu evaluieren und Rückschlüsse auf seine Eignung als bioaktiver Faktor im Implantat zu ziehen.

Bovine Knorpelstanzen wurden mit einem zentralen Defekt versehen und mit BNC bestückt. Die Konstrukte wurden in vorgeformte Agarosezylinder eingebettet und für 2, 4 bzw. 8 Wochen unter definierten Modellbedingungen (DMEM/F12 + 5% FCS + ITS) kultiviert. Ein Teil der Proben wurde dabei zusätzlich mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) stimuliert. Mittels Licht- und Rasterelektronenmikroskopie erfolgte die morphologische Beurteilung der kultivierten Knorpel-BNC-Konstrukte bezüglich Zellvitalität, Knorpelintegrität und Migrationsverhalten der Chondrozyten. Der Metabolismus von knorpelspezifischen Matrixmolekülen wie Proteoglykanen (PG), Aggrekan (Agg), Kollagen Typ II (Kol2), *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (COMP) bzw. Dedifferenzierungsmarkern wie Kollagen Typ I (Kol1) wurde immunhistochemisch sowie mittels der „*real time*“-Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISA) evaluiert.

In Zusammenschau aller Daten ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, ein robustes und universell anwendbares *In vitro*-Modell zu entwickeln, das die Langzeitkultur von Knorpelgewebe über mehrere Wochen unter Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase

ermöglicht und die frühen, initialen Stadien der endogenen Knorpelregeneration simuliert. Auch nach 8 Wochen Kultur blieb die Integrität des Knorpels trotz der für *In vitro*-Studien relativ langen Kulturdauer erhalten. Die frühen Stadien einer Matrixregeneration waren sowohl in unstimulierten als auch in TGF- $\beta$ 1-stimulierten Proben in Form einer positiven Safranin-O-Färbung sowie des immunhistochemischen Nachweises von intaktem Agg und Kol2 im umgebenden Knorpel und teilweise auch im BNC-Gerüst nachweisbar, wobei diese Ergebnisse auch auf mRNA-Ebene in den kultivierten Knorpelproben bestätigt wurden.

Ein eindeutig positiver Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Synthese von Matrixkomponenten im Verlauf der Langzeitkulturen gegenüber der Basisstimulation mit 5% FCS konnte nicht eruiert werden. Gestützt durch seine ebenfalls überlegenen Ergebnisse bezüglich der chemotaktischen und mitogenen Wirkung erscheint Serum gegenüber TGF- $\beta$ 1 als das attraktivere Mittel zur Bioaktivierung der BNC-Implantate.

Vor allem in den unstimulierten Proben verließen knorpelständige Chondrozyten zunehmend die umgebende Matrix und adhärten vermehrt auf der BNC-Oberfläche, was als deutliches Zeichen der Zyto- und Biokompatibilität des Materials gewertet wurde. Interessanterweise wurde während der Migration sowohl morphologisch als auch molekularbiologisch eine vorübergehende Dedifferenzierung der Chondrozyten in einen fibroblastoiden Zelltyp mit gesteigerter Kol1-Expression unter Repression knorpelspezifischer Matrixmoleküle wie Kol2 oder Agg beobachtet. Nach Erreichen der BNC schien sich der chondrozytäre Phänotyp allerdings schnell zu regenerieren, was auf eine redifferenzierende Wirkung des Biomaterials hindeutet. Die randständige Einlagerung neu synthetisierter Matrix in das BNC-Netzwerk sprach stark für eine beginnende Implantatintegration. Eine Invasion mobilisierter Chondrozyten in tiefere Bezirke nativer BNC wurde allerdings aufgrund des zu engmaschigen Cellulose-Netzwerkes nicht beobachtet, so dass für weiterführende Studien eine Optimierung des Porensystems zur verbesserten Zelleinwanderung notwendig sein wird. Als favorisierte Variante stellte sich dabei die postmodifikative Laserbehandlung der BNC-Implantate heraus. Auf diese Weise konnte im gesamten Implantat ein dreidimensionales Kanalsystem generiert werden, das sich *in vitro* optimal mit isolierten Zellen besiedeln ließ. Diese modifizierten BNC-Vliese stellen zum aktuellen Projektzeitpunkt den finalen Implantat-Prototypen dar.

Die vorliegende Arbeit liefert vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Eignung von BNC als potentiellies Knorpelimplantat. Offen bleibt die Frage, ob die begrenzte Eigenzellularität des Knorpels ausreicht, um die Produktentwicklung weiterhin als zellfreien Therapieansatz zu verfolgen. Diese Punkte sollen in nachfolgenden *In vivo*-Studien geklärt werden.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Aufbau und Bestandteile des hyalinen Gelenkknorpels

Hyaliner Knorpel bildet das Kernstück gesunder Gelenke. Er imponiert makroskopisch durch seine glatte, milchig durchscheinende Oberfläche und überzieht die Knochenendflächen der beweglichen Gelenke, um einen möglichst reibungsarmen Bewegungsablauf zu gewährleisten. Seine stoßelastischen Eigenschaften führen zur Minimierung kurzzeitig wirkender lokaler Druckspitzen auf den subchondralen Knochen. Auftretende Druck- und Scherkräfte werden auf diese Weise abgefangen und optimal verteilt.

Adulter Gelenkknorpel beinhaltet weder Blut- oder Lymphgefäße noch eine Innervation. Die Zufuhr der nötigen ernährenden Substanzen erfolgt *per diffusionem* bzw. durch einen Pumpmechanismus während mechanischer Belastungen, der die Synovialflüssigkeit durch das Knorpelgewebe zu pressen scheint (Simon und Radin 2001).

Wie alle Bindegewebe besteht auch hyaliner Gelenkknorpel aus einer zellulären Komponente (Chondrozyten) und einer diese Zellen umgebenden extrazellulären Matrix (EZM).

Die Chondrozyten machen nur etwa 2-5% des Knorpelgesamtvolumens aus (Stockwell 1979). Es handelt sich hierbei um strukturell und funktionell hoch differenzierte Mesenchymzellen. Typische Chondrozyten zeichnen sich durch eine sphärische Zellform mit einem maximalen Durchmesser von etwa 10 µm (Stockwell 1978) und fehlende Zell-Zell-Kontakte aus. Sie sind einzeln oder in kleineren Zellverbänden, den sog. Chondronen, in der EZM eingebettet (Buckwalter und Mankin 1998b).

Die grundlegenden Komponenten der EZM sind Wasser sowie ein Netzwerk aus strukturellen Makromolekülen (Kollagene, PG, nicht kollagene Proteine und Glykoproteine). Erst das komplexe Zusammenwirken dieser Bausteine bestimmt die knorpeltypischen Eigenschaften wie Form, Stabilität, Zugfestigkeit und Viskoelastizität (Mollenhauer und Aurich 2003).

Kollagene bilden mit 10-20% des Knorpelfeuchtgewichts die extrazelluläre Rahmenkonstruktion im chondralen Gewebe.

Kollagen Typ II (Kol2) gehört zu den fibrillären Kollagenen und stellt mit ca. 90% deren Hauptteil im adulten Gelenkknorpel dar. Es imponiert durch eine arkadenförmige Fibrillenanordnung unterschiedlicher Dicke, deren Durchmesser zwischen 20 nm in der superfiziellen und 120 nm in der tief gelegenen Knorpelschicht variiert (Eyre 2002). Kol2 verleiht dem Gewebe Widerstandsfähigkeit gegenüber Zug- und Druckbelastungen. Die Chondrozyten synthetisieren die Kollagenmoleküle intrazellulär und sezernieren sie als sog.

Prokollagene mit N- und C-terminalen Propeptiden in den Extrazellulärraum. Dort werden diese nicht helikalen Verlängerungen enzymatisch abgespalten, bevor die Formation von Kollagenfibrillen und der Einbau des funktionellen Moleküls in die EZM stattfinden.

Etwa 10% des Gesamtkollagens im Knorpel machen andere Kollagene vom Typ VI (Keene et al. 1988, Poole et al. 1992), IX (Hagg et al. 1998, Wu et al. 1992) oder XI aus (Spahn 2006), die zur Stabilisierung des extrazellulären Netzwerks beitragen. Diese Moleküle spielen im gesunden Knorpel aber wahrscheinlich eher eine additive, untergeordnete Rolle und werden nur im pathologischen Zustand vermehrt gebildet (Ostergaard und Salter 1998).

Kollagen vom Typ X (Kol10) ist ausschließlich in der Zone des kalzifizierten Knorpels anzutreffen. Ihm wird eine Rolle bei der Knorpelmineralisation zugeschrieben. In adultem Gelenkknorpel weist eine zunehmende Kol10-Synthese daher auf eine Hypertrophie der Chondrozyten im Verlauf einer Arthrose hin (Kielty et al. 1985, Kirsch und von der Mark 1991, von der Mark et al. 1992).

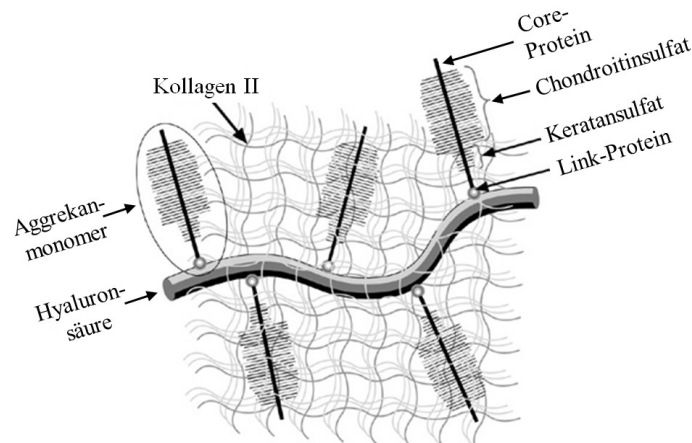
Eine Sonderstellung nimmt in diesem Bezug Kollagen Typ I (Kol1) ein. Es stellt den fibrillären Hauptanteil in Haut, Knochen und straffem Bindegewebe, wird aber im gesunden Gelenkknorpel normalerweise nicht exprimiert. Der vermehrte Nachweis von Kol1 im hyalinen Knorpel gilt daher als Dedifferenzierungsmarker für Chondrozyten und kann sowohl im Rahmen osteoarthrotischer Veränderungen als auch in Langzeitkulturen von isolierten Knorpelzellen beobachtet werden (Aulthouse et al. 1989, Miosge et al. 2004).

Ein weiterer Bestandteil der EZM sind die Proteoglykane (PG), die wiederum 10-20% des Knorpelfeuchtgewichtes ausmachen. Gemeint ist eine heterogene Gruppe komplexer, makromolekularer Glykokonjugate, deren Hauptaufgabe in der chemischen und mechanischen Bindung des Knorpelwassers liegt. Sie bestehen aus einem zentralen Protein (Core-Protein), an das negativ geladene Glykosaminoglykan-Ketten (GAG) unterschiedlicher Zusammensetzung kovalent gebunden sind. Die wichtigsten GAG der PG-Moleküle sind Chondroitinsulfat (CS), Keratansulfat (KS) und Dermatansulfat (DS).

Das größte und mit 90% Masseanteil am häufigsten vorkommende PG im Knorpel ist Aggrekan. Über die Bindung von bis zu 800 Aggrekanmonomeren an Hyaluronsäure, einem weiteren GAG und dem zentralen Bestandteil des Aggrekans, entstehen unterschiedlich große Polymeraggregate, die sich durch eine Vielzahl negativ geladener CS- und KS-Seitenketten auszeichnen (Abb. 1). Dadurch erhöht sich die Konzentration der aus dem Interstitium angezogenen Kationen (v.a. Natrium) und dementsprechend die Osmolarität innerhalb des Knorpels so entscheidend, dass Wasser (65-80% des Knorpelfeuchtgewichtes) gebunden und die stoßdämpfenden Eigenschaften des Gewebes in Form eines reversiblen



belastungsinduzierten Wasseraustritts gewährleistet werden können („Wasserkissenfunktion“). Aggrekan unterliegt während der gesamten Lebenszeit einem langsamen, aber stetigen Umsatz, wobei seine Halbwertszeit in Abhängigkeit vom untersuchten Molekülabschnitt zwischen 3 und 25 Jahren liegt (Maroudas et al. 1998).



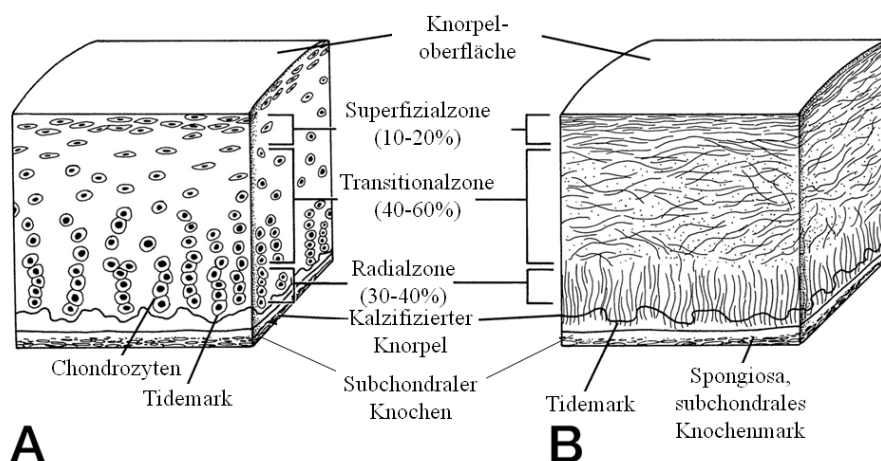
**Abb. 1: Schematische Darstellung eines Aggrekanaggregates.** Modifiziert nach [1].

Neben den Kollagenen und den PG-gebundenen Proteinen kommt in wesentlich geringerer Konzentration eine Vielzahl weiterer Proteine und Glykoproteine in der hyalinen Knorpelmatrix vor, deren Funktion aber längst nicht so gut untersucht ist. Hierzu zählen v.a. Link-Proteine wie das *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (COMP). COMP ist im gesunden Gelenkknorpel vorwiegend in der perizellulären Matrix lokalisiert (Hedbom et al. 1992). Es scheint in entscheidendem Maße an der Fibrillogenese im Knorpel beteiligt zu sein, indem es als Katalysator der Fibrillenformation aus einzelnen Kollagenmolekülen fungiert. Natives COMP bindet mit hoher Affinität an Kol1 und Kol2 und kann aufgrund seiner homopentameren Struktur fünf Kollagenmoleküle zugleich assoziieren, was eine beschleunigte Bildung von Mikrofibrillen induziert (Halasz et al. 2007, Zaia et al. 1997). Bei Erkrankungen, die mit einem Abbau von Gelenkknorpel einhergehen (entzündlich, traumatisch, degenerativ), scheint die Expression von COMP deutlich hochreguliert zu sein. Dies wird u.a. als Zeichen eines Reparaturversuchs der Chondrozyten interpretiert (Salminen et al. 2000). Im Verlauf der Destruktion entstehen Fragmente des Matrixproteins, die zunächst in die Synovialflüssigkeit und anschließend in die Blutzirkulation gelangen, wodurch COMP von einigen Autoren auch als Knorpeldegenerationsmarker betrachtet wird (Fife 1988, Habenbauer et al. 2003, Neidhart et al. 1997, Petersson et al. 1998, Salminen et al. 2000).

Die Zusammensetzung und Struktur der einzelnen Knorpelkomponenten sind nicht homogen im gesamten Gelenkknorpel, sondern verändern sich in Abhängigkeit von der Entfernung zur

Gelenkfläche (Abb. 2). Morphologisch unterscheidet man vier verschiedene Zonen (Buckwalter und Mankin 1998b, Poole et al. 2001), die sich in Größe und Form der Zellen, der Orientierung zur Gelenkfläche und der metabolischen Aktivität unterscheiden.

- I. In der Superfizial- bzw. Tangentialzone, die mit 10-20% der Knorpeldicke die dünnste Lage des Gewebes ausmacht, finden sich v.a. abgeflachte, ellipsoide Chondrozyten. Diese sind perlschnurartig und parallel zur Oberfläche angeordnet und von einem dünnen Flüssigkeitsfilm aus Lubricin und Hyaluronsäure, der sog. Lamina splendens, überzogen, die eine reibungsarme Gleitbewegung der Gelenkflächen gewährleistet. Die darunterliegenden Chondrozyten produzieren Kollagene in hohen Konzentrationen, dafür nur niedrig konzentrierte PG. Durch die parallele Anordnung der Kollagenfibrillen zeichnet sich die superfizielle Knorpelschicht als Zone mit der größten Zug- und Druckfestigkeit aus (Bullough und Goodfellow 1968, Kempson et al. 1973). Außerdem herrscht in der superfiziellen Schicht gleichzeitig der höchste Wasseranteil als Grundlage für die stoßdämpfenden Eigenschaften des Gewebes.
- II. In der Transitionalzone (40-60% der Knorpeldicke) herrscht eine deutlich geringe Zelldichte vor. Die vorwiegend spheroidal geformten Chondrozyten liegen eingebettet in reichlich EZM, die nun einen höheren Anteil an PG, dafür aber weniger Wasser und Kollagen enthält als die oberflächliche Knorpelschicht. Zudem haben die Matrixfibrillen hier einen größeren Durchmesser und sind eher netzartig angeordnet.



**Abb. 2: Schematische Darstellung des Knorpelaufbaus zur Veranschaulichung der zonalen Gliederung und der Chondrozytenarchitektur (A) sowie der Fibrillenformation des Kollagens (B). Modifiziert nach (Newman 1998).**

- III. Die Zellen der Radialzone (30% der Knorpeldicke) nehmen in ihrer Dichte noch weiter ab. Sie sind rund und perpendicular zur Knorpeloberfläche angeordnet und von Matrix mit dem höchsten PG-Gehalt und den dicksten Kollagenfibrillen des Knorpels

umgeben (Venn 1979). Außerdem zeigen sie eine zehnfach höhere Syntheseaktivität als die in den oberflächlichen Zonen des hyalinen Knorpels lokalisierten Zellen (Wong et al. 1996). Die senkrecht verlaufenden Fasern tauchen in die sog. „tidemark“ ein, die Grenze zwischen nicht-kalzifizierter und kalzifizierter Matrix. Diese ist lichtmikroskopisch in gefärbten Präparaten als basophile Linie sichtbar.

- IV. Die dünne Zone des kalzifizierten Knorpels bildet den Übergang zum subchondralen Knochen. Charakteristisch für diese tiefste Knorpelschicht sind hypertrophe Chondrozyten, die für die Synthese von Koll10 und die damit verbundene Kalzifizierung der umgebenden Knorpelmatrix verantwortlich sind. Diese Zellen sind rund, kleiner und metabolisch kaum aktiv.

## **2.2 Pathogenese und Regenerationsmechanismen von Knorpeldefekten**

Hyaliner Gelenkknorpel besitzt aufgrund seiner besonderen Gewebeanatomie eine insgesamt sehr limitierte Selbstheilungskapazität. Andere Bindegewebsarten reagieren auf Verletzungen typischerweise mit einer Kaskadenreaktion aus Nekrose, Inflammation, Granulation und narbigem Gewebsumbau. Die vaskuläre Phase, in der eine Migration von Zellen mit regenerativer Potenz aus dem Blut in das verletzte Areal zu beobachten ist, stellt dabei die wichtigste Determinante im Heilungsprozess dar (Bhosale und Richardson 2008). Aufgrund seiner Avaskularität fehlt dem Knorpel diese Fähigkeit zur klassischen mehrphasischen Wundheilung. Neben der geringen Zellzahl wird außerdem die Abgrenzung der Chondrozyten von der Defektzone durch die umgebende EZM und ihre limitierte Proliferations- und Migrationsfähigkeit für die verminderte endogene Regenerationstendenz verantwortlich gemacht (Hardingham et al. 1992, Khan et al. 2008).

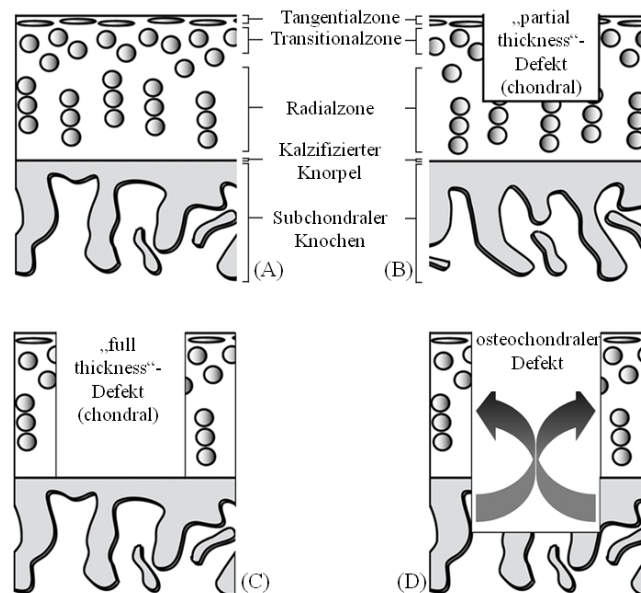
### **2.2.1 Traumatische Knorpelschäden**

In der Gruppe jüngerer, aktiver Patienten spielen v.a. Knorpelschäden traumatischer Genese eine entscheidende Rolle (Mink und Deutsch 1989, Wojtys et al. 1987). Sie beruhen entweder auf dem akuten, intensiven Einwirken von Spitzenbelastungen mit überkritischer Beanspruchung des ansonsten gesunden Gelenkknorpels im Sinne von Kontusion, Distorsion und Luxation oder aber auf repetitiven Impulsbelastungen, die in ihrer Summe zur Mikrotraumatisierung der Knorpeloberfläche führen.

Im Gegensatz zum arthrotischen Knorpel sind die Chondrozyten in den Randbezirken traumatischer Defekte größtenteils voll aktiv und lassen aufgrund intrinsischer

Reparationsmechanismen eine Defektregeneration zumindest begrenzt möglich erscheinen. Daher müssen traumatische Schäden nicht zwangsläufig zu Substanzdefiziten führen. Die wichtigsten Einflussfaktoren dieser endogenen Regeneration sind Größe und Tiefe des Knorpeldefektes sowie das Alter des Patienten (Buckwalter und Mankin 1998a, Mankin 1982). Klinisch unterscheidet man abhängig von der Defekttiefe zwei Kategorien:

- I. Der chondrale Defekt ist als reiner Knorpelgewebsverlust definiert, der eine Beteiligung der subchondralen Knochenlamelle ausschließt. Dieser kann entweder nur auf die oberflächlichen Knorpelschichten beschränkt bleiben (partial thickness/ flap-Defekt, Abb. 3B) oder aber die gesamte Knorpeldicke durchsetzen (full thickness-Defekt, Abb. 3C).



**Abb. 3: Klassifizierung von Knorpeldefekten.** Modifiziert nach (Khan et al. 2008).

Im Sinne endogener Kompensationsversuche des Knorpel sind im Defektbereich häufig Cluster oder Hyperzellularität von Chondrozyten als Folge einer gesteigerten Zellproliferation sowie ein erhöhter Chondrozytenstoffwechsel mit gesteigerter Synthese von Matrixbestandteilen (v.a. PG) nachzuweisen. Ab einem kritischen Läsionsdurchmesser von 2 mm kann es jedoch zu keinem vollständigen Gewebsaufbau durch diese Zellen kommen (König und Kirschner 2003).

- II. Osteochondrale Defekte sind tiefe Gelenkknorpelverletzungen, die die subchondrale Knochenlamelle penetrieren und einen Zugang zum Knochenmark eröffnen (Abb. 3D). Nach Einblutung und initialer Defektfüllung mit einem Fibrinkoagel kommt es zur Einwanderung mesenchymaler Stammzellen (MSZ) aus dem Knochenmark, die in

Abhängigkeit ihrer Ausdifferenzierung beginnen, eine EZM mit unterschiedlich hohem PG-Gehalt zu synthetisieren. Das entstehende fibröse Reparaturgewebe ist aber gegenüber nativem Knorpel in jedem Fall biomechanisch und strukturell deutlich minderwertig und nimmt kaum an der Lastübertragung und -kompensation des Knorpels teil (Mitchell und Shepard 1976, Temenoff und Mikos 2000).

### 2.2.2 Degenerative Knorpelschäden

Wie alle Gewebe unterliegt auch der Gelenkknorpel altersabhängig morphologischen und funktionellen Veränderungen, die sich jedoch wesentlich von den pathologischen Vorgängen des degenerativ veränderten Knorpels bei Arthrosen und anderen Gelenkerkrankungen unterscheiden (Buckwalter und Mankin 1998a).

Die Osteoarthritis (OA) ist die weltweit häufigste Gelenkerkrankung und ist gekennzeichnet durch eine enorme sozioökonomische Belastung sowie erhebliche individuelle Beeinträchtigungen der Patienten infolge von Schmerzen und Bewegungseinschränkungen. Ursächlich für die Degeneration des hyalinen Knorpels scheint dabei ein Missverhältnis von anabolen und katabolen Prozessen zugunsten der Abbauvorgänge im Knorpel zu sein. Zu den wichtigsten auslösenden Mechanismen gehören die erworbenen und altersbezogenen Veränderungen des Zell- und Hormonstoffwechsels. Das Vorliegen bestimmter Risikofaktoren wie Achsfehlstellungen, Deformitäten, Traumata (Gelber et al. 2000) oder Überlastungen der Gelenke (Maetzel et al. 1997), frühere operative Eingriffe am Bewegungsapparat (Roos et al. 1998), ein erhöhter *Body Mass Index* (BMI) (Manninen et al. 1996), falsche Ernährung oder hormonelle Einflüsse (Hart et al. 1999) sollen diese Prozesse noch zusätzlich verstärken. Die Degeneration führt über eine initiale Matrixzerstörung auf molekularer Ebene (Mankin 1974) zu einer Erweichung und Ausdünnung des Gelenkknorpels mit makroskopisch sichtbaren Fibrillationen und Matrixabbau. Die Chondrozyten reagieren auf diese Veränderungen zunächst kompensatorisch mit vermehrter, eher unkontrollierter Proliferation und verstärkter Neusynthese von Matrixkomponenten. Parallel dazu kommt es allerdings zur progredienten Degradation der interstitiellen Matrix, zum Zerfall des Kollagengerüsts und zum zunehmenden Verlust der mechanischen Knorpelfestigkeit. Fibronektin-Fragmente und andere Moleküle treten nun isoliert im geschädigten Gewebe auf und bewirken die Freisetzung knorpeldestruierender Zytokine (z.B. Interleukin-1, IL-1) und Enzyme (z.B. Matrixmetalloproteinasen, MMP), die zum weiteren Abbau der Matrix führen (Chevalier 1993). V.a. durch die Verringerung des PG-Gehaltes wird das in der EZM gebundene Wasser bei Belastungen schneller abgegeben. Der Knorpel verliert zunehmend an

Kompressibilität und stoßabsorbierenden Eigenschaften, was nachhaltig zum progressiven Verschleiß der Gelenkknorpelschicht beiträgt (Kleemann et al. 2005). In der Endphase des arthrotischen Prozesses können die Chondrozyten den sukzessiven Knorpeluntergang durch ihre Mehraktivität nicht mehr ausgleichen. Im Rahmen der Knorpelschädigung nimmt die Zahl der apoptotischen Zellen signifikant zu. Die untergegangenen Chondrozyten werden in eine zunehmende Kalzifizierung involviert (Hashimoto et al. 1998b, Hashimoto et al. 1998a). Es kommt zum kompletten Verlust der Knorpelschicht bis hin zur vollständigen Knochenglatze. Durch die in der Folge entstehenden Begleitreaktionen im subchondralen Knochen (Sklerosierung, Geröllzysten, Osteophyten) erlangte die OA als Vollbild der degenerativen Gelenkerkrankung ihren Namen.

## **2.3 Etablierte Therapiekonzepte bei Gelenkknorpeldefekten**

Aufgrund der hohen sozioökonomischen Bedeutung invalidisierender Gelenkknorpelerkrankungen stellt die Entwicklung suffizienter Behandlungsstrategien eine der großen Herausforderungen an die orthopädisch-chirurgische Forschung der letzten Jahre dar. Primäre Ziele sind dabei die Wiederherstellung einer normalen Gelenkfunktion mit schmerzloser Beweglichkeit sowie die Verhinderung einer fortschreitenden Knorpeldegeneration. Die momentan existierenden, vielfältigen konservativen und operativen Verfahren zur Behandlung von Knorpeldefekten bewirken jedoch i. d. R. nur eine vorübergehende Linderung der Beschwerden und erreichen in der Langzeitprognose eher unbefriedigende Ergebnisse. Der totalendoprothetische Gelenkersatz (TEP) bleibt daher weiterhin die einzige definitive Lösung. In der BRD werden derzeit jährlich ca. 100 000 Knie-TEP implantiert (Kruckhans und Dustmann 2004). Aufgrund demografischer Daten ist in den nächsten Jahren mit einem deutlichen Anstieg zu rechnen. Prothesenlockerungen nach etwa 10-15 Jahren sind dabei ein nicht zu verhindernder Vorgang, der im Vergleich zu den Primäroperationen wesentlich aufwendigere und komplikationsreichere Wechsel-OPs erforderlich macht. Daher wird die Erstimplantation einer TEP möglichst erst nach dem 60. Lebensjahr angestrebt.

### **2.3.1 Lavage, Shaving und Débridement**

Bei nur geringen chondralen Schädigungen bieten sich symptomatische Behandlungen wie Lavage, Shaving oder Débridement an. Die als „Gelenktoilette“ zusammengefassten, arthroskopischen Verfahren dienen der Ausspülung abgelöster Knorpelfasern und freier Gelenkkörper (Lavage), der oberflächlichen Abtragung strukturveränderter Knorpelanteile (Shaving) und der Entfernung mechanischer Gelenkiritationen mit anschließender Glättung

der Knorpeloberfläche (Débridement). Durch die Reduktion der begleitenden Entzündungsprozesse verschwinden bei einem Großteil der Patienten kurzfristig die Schmerzen, mittelfristig (innerhalb der nächsten 5 Jahre) können in etwa 50% der Fälle zufriedenstellende Resultate verzeichnet werden (Buckwalter und Lohmander 1994). Dennoch handelt es sich um rein symptomatische Therapieverfahren, die das Fortschreiten der Degeneration nicht nachhaltig aufhalten können. Die Entfernung abnormaler Knorpelanteile aus lasttragenden Gelenkbezirken bedingt eine weitere Einschränkung der mechanischen Belastbarkeit. Der angrenzende gesunde Knorpel reagiert auf den Eingriff unter Umständen mit Auffaserungen und Nekrose (Kim et al. 1991).

### **2.3.2 Abrasio und Mikrofrakturierung**

Einen weiteren Ansatz in der invasiven Therapie von Gelenkknorpeldefekten stellt die Anregung der Knorpelregeneration unter Ausnutzung des chondrogenen Potentials von MSZ aus dem Blut oder Knochenmark dar.

Bei kleineren Läsionen ( $< 1 \text{ cm}^2$ ) werden die betroffenen Knorpelbereiche sowie Teile des darunterliegenden subchondralen Knochens mittels Abrasionsplastik bis zum Sichtbarwerden kleiner Einblutungen abgetragen.

Bei größeren Knorpeldefekten mit einer Größe von etwa  $2,5 \text{ cm}^2$  hingegen ist eine gezielte Eröffnung des Knochenmarks durch systematische Penetration der subchondralen Knochenlamelle mittels Kirschnerdrähten oder Bohrern, die sog. Mikrofrakturierung, die Therapie der 1. Wahl (Steinwachs et al. 2008).

Ziel des Verfahrens ist die initiale Abdichtung des Knorpeldefekts durch einen Blutkoagel (sog. „super clot“), der gleichzeitig multipotente MSZ aus dem Blut oder Knochenmark enthält. Neben biologischen Faktoren sollen sie v.a. durch mechanische Belastung zur chondrogenen Differenzierung angeregt werden, um durch entsprechende Matrixsynthese eine Revitalisierung des Knorpeldefektes zu erreichen. Das von ihnen synthetisierte Regeneratmaterial besteht jedoch überwiegend aus fibrösem oder sogar knöchernem Knorpel, der in seinen funktionellen Eigenschaften und seiner biomechanischen Stabilität gegenüber dem hyalinen Ausgangsmaterial deutlich minderwertig ist, den Belastungen im Gelenk langfristig nicht Stand halten kann und frühzeitig zu Verschleiß und Abnutzung neigt (Brown et al. 2004, Sledge 2001, Temenoff und Mikos 2000).

Vorteile dieses Verfahrens sind ihre einzeitige, arthroskopische Durchführbarkeit und ihre Kosteneffektivität. Seine klinischen Ergebnisse sind allerdings stark altersabhängig (Kreuz et al. 2006, Steinwachs et al. 2008) und zeigen im Vergleich mit der autologen

Chondrozytentransplantation (ACT) sowohl kurzfristig als auch im 5-Jahres-Outcome keine signifikanten Unterschiede (Knutsen et al. 2004, Knutsen et al. 2007).

Im Zuge des wissenschaftlichen Fortschritts bedient sich die Mikrofrakturierung mittlerweile resorbierbarer Biomaterialien als gerüstbildende Trägersubstanz (z.B. chondrotissue®, BioTissue Technologies, Freiburg) (Erggelet et al. 2009). Die arthroskopisch implantierbaren Scaffolds gewährleisten eine initiale Stabilität im Defektbereich und dienen den einströmenden MSZ als Gerüst für die Clot-Organisation, stehen aber aufgrund ihrer Resorptionszeit von etwa drei bis vier Monaten in zeitlichem Wettlauf mit der wesentlich langsameren Synthese des Regeneratgewebes.

### **2.3.3 Osteochondrale Transplantation**

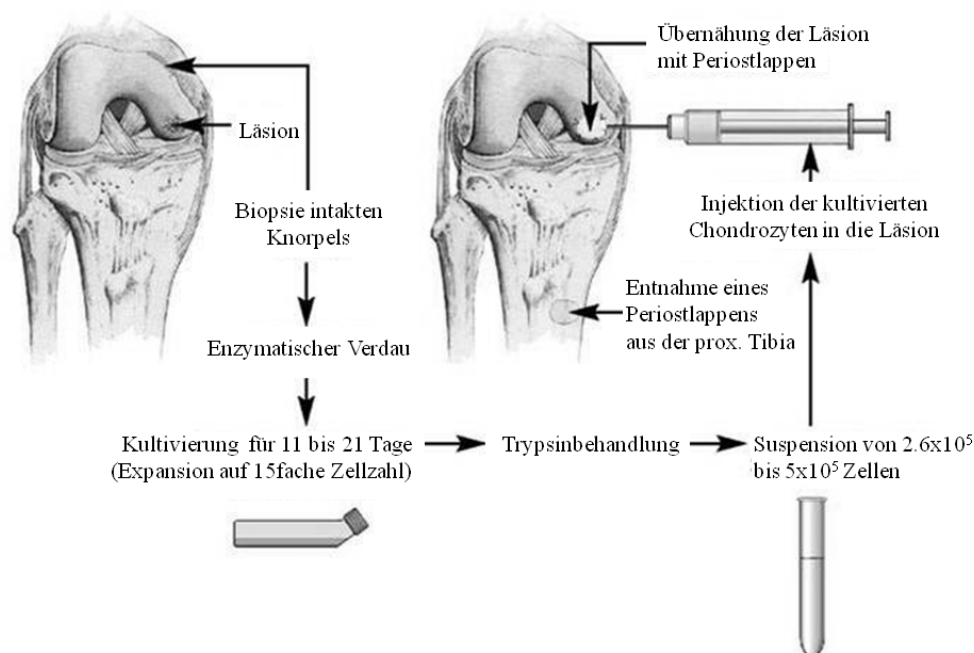
Bei der Anwendung eines „osteochondralen autologen Transplantsystems“ (OATS) werden arthroskopisch oder in offener Technik autologe Knorpel-Knochen-Zylinder aus weniger belasteten Gelenkbereichen entnommen und mittels Press-Fit-Technik in die Defektregion implantiert. Funktionstüchtige Gelenkfläche wird somit in die Hauptbelastungszone versetzt und die degenerativ oder traumatisch bedingten Knorpelläsionen durch hyalinen Knorpel aufgefüllt. Durch die Verwendung mehrerer, im Durchmesser kleiner Knochen-Knorpel-Zylinder können auf diese Weise auch größere Defekte mosaikartig gedeckt werden (Hangody et al. 1998). Wegen der begrenzten Verfügbarkeit des Spendermaterials wird jedoch eine Defektgröße von höchstens 4 cm<sup>2</sup> empfohlen. Nachteile des Verfahrens liegen in der unterschiedlichen Knorpeldicke und der mangelnden Kongruenz der Gelenkkonvexität zwischen transplantiertem und umliegendem Knorpel sowie spezifischen Komplikationen wie sekundären Knochenzysten, avaskulären Nekrosen oder Transplantatbrüchen.

### **2.3.4 Autologe Chondrozytentransplantation**

In der Behandlung größerer oder tiefer Knorpeldefekte hat sich v.a. bei jüngeren Patienten die „autologe Chondrozytentransplantation“ (ACT) zum Goldstandard entwickelt. In einer Reihe teils prospektiv randomisierter Studien hat sich die ACT beim Erwachsenen als bisher zuverlässigstes Rekonstruktionsverfahren bei Defektgrößen ab 4 cm<sup>2</sup> erwiesen (Behrens et al. 2004). In der klassischen Technik nach Brittberg *et al.* (Brittberg et al. 1994) werden dem Patienten sechs Wochen präoperativ in einem arthroskopischen Eingriff zunächst geringe Mengen an Spenderknorpel aus wenig belasteten Gelenkbereichen entnommen. Die nach enzymatischem Verdau isolierten Chondrozyten werden in den nächsten Wochen in Zellkultur auf die 15- bis 20-fache Zellzahl expandiert und in einem zweiten invasiven



Eingriff mittels Arthrotomie als Zellsuspension in die Defektzone injiziert. Zur Abdeckung wird diese mit einem aus der Tibiaoberfläche gewonnenen Periostlappen übernäht und mit Fibrinkleber abgedichtet (Abb. 4). Ziel der Methode ist die Auffüllung des Defektareals mit von den eingebrachten Chondrozyten synthetisierter EZM, die in ihren histologischen und biomechanischen Eigenschaften denen des nativen Gewebes möglichst ähnlich ist.



**Abb. 4: Prinzip der ACT.** Modifiziert nach (Brittberg et al. 1994).

Obwohl die prinzipielle, mittelfristige Regenerationsfähigkeit hyalinen Knorpels unter Verwendung der ACT in klinischen Studien mehrfach belegt wurde (Minas 2001, Peterson et al. 2000, Peterson et al. 2003), weist die Methode dennoch eine Reihe von Nachteilen auf. Ein allgemeines Problem stellt die Gewinnung ausreichender Zellzahlen zur Deckung größerer Knorpeldefekte dar. Während der notwendigen Expansionsphase in Monolayer-Kultur neigen die isolierten Chondrozyten häufig zur Dedifferenzierung mit vermehrter Expression von unspezifischem Kol1 und Kol3 gegenüber einer Herab-Regulation knorpelspezifischer Gene wie Kol2, Kol9 und Kol11 bzw. Aggrekan (Darling und Athanasiou 2005, Elima und Vuorio 1989, Schnabel et al. 2002, Velikonja et al. 2001). Diverse Studien weisen zudem auf die Gefahr einer Transplantathypertrophie hin, die vermutlich durch die aufgenähten Periostlappen verursacht wird (Fritz et al. 2005, Peterson et al. 2000). Desweiteren stellen die hohen Verfahrenskosten, die iatrogene Schädigung gesunder Knorpelareale sowie die Notwendigkeit eines zweizeitigen Eingriffs und die damit verbundene hohe Belastung des Patienten Kritikpunkte der ACT dar.

Zur Optimierung der Fixierungs- und Dedifferenzierungsproblematik der autologen Knorpelzellen wurden verschiedene Biomaterialien als dreidimensionale Trägersubstanzen entwickelt. Für das unter dem Namen „Matrix-gekoppelte autologe Chondrozyten-transplantation“ (MACT) zusammengefasste Verfahren befinden sich mittlerweile beispielsweise Kollagengele (z. B. Novocart® 3D, Tetec AG, Reutlingen), Hyaluronsäuregele (z. B. Hyalograft C®, Fidia Advanced Biopolymers, Italien) (Nehrer et al. 2006) und textile resorbierbare Biopolymere (z. B. Bioseed C®, BioTissue Technologies, Freiburg) (Kreuz et al. 2009) in der klinischen Anwendung. Die mit autologen Chondrozyten beimpften, dreidimensionalen Trägersubstanzen gewährleisten neben einer gleichmäßigeren Zellverteilung auch eine einfachere Handhabung für den Operateur und bieten während der Regenerationszeit initiale mechanische Stabilität im gefüllten Defektbereich. Den limitierenden Faktor in der Anwendung der MACT stellt die Asynchronität zwischen der Resorptionsgeschwindigkeit des Implantatmaterials und der Regenerationsgeschwindigkeit des Knorpels dar. Implantatmaterialien wie Kollagen-, Hyaluronsäurematrices oder synthetische Biopolymere wie Polylactid-co-glycolid (PLGA) und Polyglycolid (PGA) werden vom Körper innerhalb von wenigen Wochen vollständig resorbiert (Britt und Park 1998, Gaissmaier et al. 2005). Der Aufbau funktionstüchtigen neuen Knorpels allerdings bedarf einer Zeitspanne von mehreren Monaten bis zu einem Jahr.

## **2.4 Innovative Forschungsansätze hinsichtlich endogener Knorpelregeneration**

Die Behandlung substantieller Defekte des Gelenkknorpels stellt aufgrund seines begrenzten Selbstheilungspotentials bis heute eine enorme Herausforderung an die orthopädisch-chirurgische Forschung dar. Alle momentan am Markt befindlichen zellhaltigen oder zellfreien Knorpelersatzmaterialien lieferten bislang keine ausreichend zufriedenstellenden Ergebnisse bezüglich der Neosynthese vollwertigen Regenerationsknorpels.

Die AG „Experimentelle Rheumatologie“ des Universitätsklinikums Jena verfolgt daher gemeinsam mit seinen Verbundpartnern im BMBF-Projekt „BioInside - Bioaktive Implantate zur Reparatur und Regeneration von Defekten des Weichgewebes“ einen innovativen Ansatz zur Förderung des intrinsischen Regenerationspotentials im Gelenkknorpel.

Dabei soll ein zellfreies, bioaktives Knorpelimplantat auf der Basis bakterieller Nanocellulose (BNC) entwickelt werden. Durch das Einbringen von Wachstumsfaktoren bzw. Chemokinen in das Gerüst soll die Einwanderung von ortsständigen Zellen in das defektfüllende Implantat gefördert und die Ausbildung von Knorpelmatrix angeregt werden. Aufgrund seiner chondroinduktiven und anabolen Wirkung wird v.a. der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 als

potentieller bioaktiver Faktor im Implantat diskutiert. Die nicht resorbierbare BNC soll als mechanisch stabiles Scaffold fungieren, das durch das gebildete Regenerationsgewebe aufgefüllt wird. Die theoretischen Grundlagen des Vorhabens seien im Folgenden erläutert.

#### **2.4.1 Bakterielle Nanocellulose als bioaktives Knorpelimplantat**

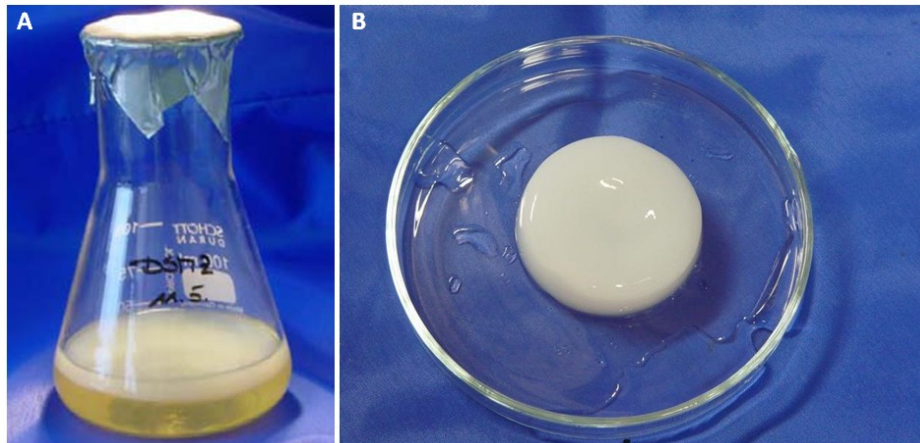
BNC machte in den letzten Jahren als erfolgversprechendes, alternatives Biomaterial in verschiedenen Bereichen der regenerativen Medizin vielfach auf sich aufmerksam. Seit ihrer Erstbeschreibung im Jahre 1886 durch Brown (Brown 1886) hat sich die Wissensbasis bezüglich ihrer Synthese und des strukturellen Aufbaus enorm verbreitert:

*Gluconacetobacter spec.*, insbesondere *G. xylinum*, dienen nach dem heutigen Forschungsstand als Modellorganismus sowie Hauptproduktionsquelle für sämtliche BNC-Analysen. Für die gezielte Biosynthese unter Laborbedingungen werden die streng aeroben, gramnegativen Stäbchen in einem definierten Medium (Hestrin und Schramm 1954) mit D-Glucose als primärer Kohlenstoffquelle kultiviert. Unter statischer Fermentation entstehen so an der Grenzfläche zwischen Medium und Luft flächige Membranen aus BNC (Abb. 5). Durch Variation des Kulturgefäßes, des Bakterienstammes und der Kulturbedingungen kann die Struktur und das Design der BNC während ihrer Synthese gezielt modifiziert werden (Heßler 2007, Heßler und Klemm 2009).

BNC besteht zwar ebenso wie die pflanzlichen Cellulosemoleküle aus mehreren hundert bis tausend 1,4- $\beta$ -glykosidisch verknüpften Glukoseeinheiten, kann aber in wesentlich höherer Reinheit gewonnen werden. Außerdem haben die von Bakterien gebildeten Cellulosefasern einen Durchmesser von lediglich 70-150 nm (Klemm et al. 2005), der Grund für die Bezeichnung „Nanocellulose“.

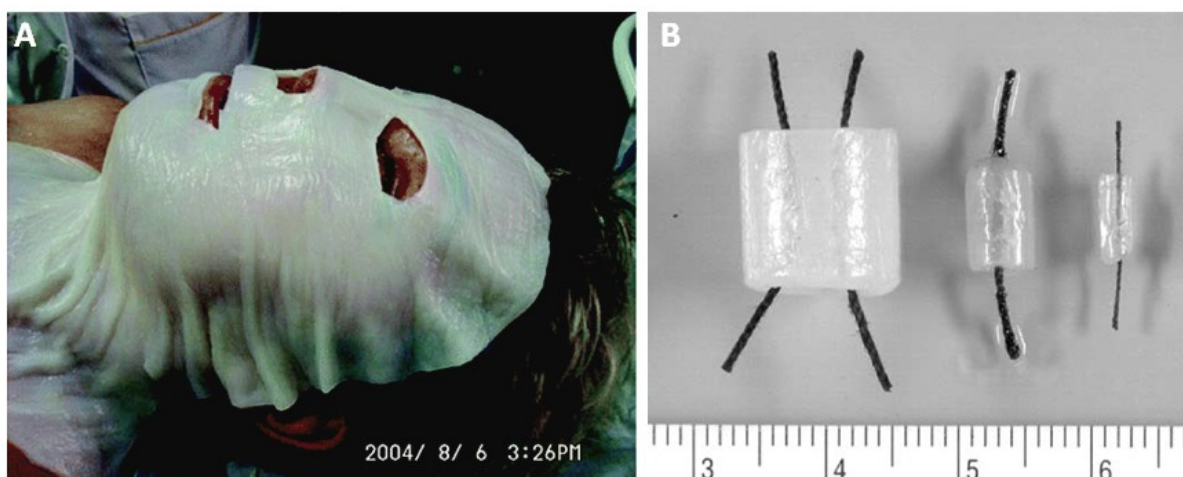
Aufgrund der Vielzahl von freien OH-Gruppen und der damit verbundenen extremen Hydrophilie weist native BNC einen hoch gequollenen Zustand mit einem Wasseranteil von bis zu 99% auf und bleibt daher bis zu einem gewissen Grad formstabil gegenüber einwirkender Kompression. Unter Zugbelastung zeigen Einzelfasern der BNC aufgrund ihres verhältnismäßig hohen Polymerisations- und Kristallisationsgrades eine biomechanische Belastbarkeit, die mit der von Stahl oder Kevlar vergleichbar ist (Klemm et al. 2001). Weiterhin verursacht das Material im tierischen Organismus keinerlei Fremdkörperreaktionen (Helenius et al. 2006) bzw. zytotoxische Effekte (Chen et al. 2009) und kann daher als biokompatibel und nicht-toxisch eingestuft werden. Die biomechanischen Eigenschaften Stabilität, Elastizität und Flexibilität kombiniert mit einer hohen Wasserbindungsfähigkeit und nachgewiesener Nontoxizität machen BNC zu einem neuen, attraktiven Biomaterial für

medizinische Anwendungsbereiche (Hoenich 2006). Dabei ist v.a. die nanostrukturierte Morphologie des Materials von Interesse, da ihre große innere Oberfläche ausgedehnte Interaktionsflächen für Zellen bietet und deren Adhäsion, Proliferation sowie die Ausbildung neuen Gewebes fördert (Pattison et al. 2005).



**Abb. 5: Flächiges Hydrogel aus bakterieller Nanocellulose während statischer Kultivierung (A) bzw. nach Aufreinigung (B).** Modifiziert nach (Kramer 2008).

V.a. auf dem Gebiet der Wundheilung und Hautregeneration zeigte sich bereits ihr hohes klinisches Anwendungspotential. Derzeitig zugelassene Medizinprodukte auf der Basis von BNC existieren in Form von Wundauflagen zur Behandlung von Verbrennungen, Ulzera und als temporärer Hautersatz (Biofill ®, Bioprocess ®, Abb. 6A) sowie zur Therapie von parodontalen Erkrankungen (Gengiflex ®) (Czaja et al. 2007, Fontana et al. 1990).



**Abb. 6: Klinische Anwendungsbereiche bakterieller Nanocellulose.** (A) Biofill®-Wundauflagen zur Behandlung von Verbrennungen, Ulzera und als temporärer Hautersatz (Czaja et al. 2007). (B) BASYC®-Tubes für die mikrochirurgische Anwendung als Gefäßersatz (Klemm et al. 2001).

Nicht zuletzt aufgrund seiner robusten biomechanischen Eigenschaften erscheint BNC auch als orthopädisches Implantatmaterial zur Meniskus- (Bodin et al. 2007), Knochen- (Hutchens et al. 2006) und Knorpelreparatur (Svensson et al. 2005) einsetzbar.

Durch die Verwendung von Bakteriencellulose als potentielltes Knorpelimplantat ließen sich bei erfolgreicher Umsetzung die oben angeführten Nachteile der bestehenden Knorpeltherapien möglicherweise umgehen:

- Ein entscheidendes Problem aller resorbierbaren Materialien besteht darin, dass die Geschwindigkeit und Art des Implantatabbaus mit der Aufbaugeschwindigkeit des Knorpels synchronisiert werden müssen, um die einwandfreie Funktion des zu regenerierenden Knorpels zu gewährleisten. BNC hingegen ist im menschlichen Organismus nicht degradierbar und kann über den gesamten Regenerationszeitraum hinweg die nötige mechanische Stabilität im Bereich des Defektes bieten.
- Nach derzeitigem Therapiekonzept soll BNC als zellfreies Knorpelimplantat agieren. Eine initiale Gewinnung autologer Chondrozyten aus primär gesunden Knorpelarealen mit allen verbundenen Nachteilen (vgl. 2.3.4 MACT) wäre damit nicht notwendig. Durch diese Entindividualisierung könnte das Implantat in großen Mengen hergestellt, gelagert und direkt bei Bedarf in einem einzeitigen Eingriff eingesetzt werden.

#### **2.4.2 Einsatz von TGF- $\beta$ als bioaktiver Faktor**

Das Verständnis des Knorpelstoffwechsels und seiner Regulation über verschiedene Interaktionen zwischen Chondrozyten, EZM und involvierten Wachstumsfaktoren bzw. Zytokinen war in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen (Trippel 1995, van der Kraan et al. 2002). Durch die Identifikation chondrogener Schlüsselmediatoren erscheint es mittlerweile möglich, die Proliferation, Differenzierung und Matrixsynthese von Chondrozyten gezielter zu stimulieren. Diese Tatsache soll auch bei der Entwicklung eines neuen Knorpelimplantates auf der Basis von BNC genutzt werden. Die Bindung bestimmter Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren an das Konstrukt und deren kontrollierte Freisetzung soll die Rekrutierung, Adhäsion, Proliferation und Matrixneosynthese begünstigen und dem Implantat letztendlich einen bioaktiven Charakter verleihen.

Neben *Insulin-like Growth Factor* (IGF-1) (Barone-Varelas et al. 1991, Luyten et al. 1988, Sah et al. 1994, van Osch et al. 1998a, van Susante et al. 2000) und *Fibroblast Growth Factor* 2 (FGF-2) (Osborn et al. 1989, Sah et al. 1994) hat sich besonders TGF- $\beta$ 1 als ein

bevorzugtes chondrogenes Additivum in der Knorpelforschung etabliert und wird im Verbundprojekt als attraktivster Kandidat diskutiert.

Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie, unter ihnen die TGF- $\beta$ -Isoformen 1 bis 5 und die Gruppe der *Bone morphogenetic proteins* (BMP), gehören zu den wohl komplexesten bekannten Zytokinen. Ihnen wird eine potente Rolle bezüglich Proliferations- und Differenzierungsvorgängen in beinahe jedem Gewebe zugeschrieben, wobei heute bekannt ist, dass sie sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Effekte auf eine Vielzahl von Zelltypen ausüben (Boyd und Massague 1989, Suardet et al. 1992) und diese über die Bindung an spezifische, membranständige Rezeptoren vermitteln. Die beiden TGF- $\beta$ -Rezeptoren Typ 1 und 2 (T $\beta$ RI/II) gehören dabei zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen. Sie formen bei Bindung des Polypeptids einen heterodimeren Komplex und lösen über eine intrazelluläre SMAD-Kaskade die eigentliche Signaltransduktion in den Zellkern aus (Derynck 1994, Wrana et al. 1994). TGF- $\beta$  induziert die Differenzierung embryonaler (Cancedda et al. 1995), aber auch adulter mesenchymaler Stammzellen zu Chondrozyten (Johnstone et al. 1998, Mackay et al. 1998, Matsuda et al. 2005) und gilt deswegen als wichtiger Induktor der Chondrogenese. Der Einfluss von TGF- $\beta$  auf reife Chondrozyten wird von verschiedenen Autoren kontrovers diskutiert. Einige Arbeiten belegen eine mitogene Wirkung von TGF- $\beta$  auf reife Knorpelzellen (Bujia et al. 1994, Pei et al. 2002, Zimmer et al. 1995), die mit einer gesteigerten Syntheseleistung knorpelspezifischer Matrixproteine wie Kollagenen und GAG einhergeht (Bujia et al. 1996, Redini et al. 1988). Darüber hinaus existieren Arbeiten, die Unterschiede im Zytokineffekt in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der stimulierten Zellen beschreiben. So reagieren primäre, reife Kaninchenchondrozyten auf TGF- $\beta$ -Stimulation mit einer verminderten, dedifferenzierte Zellen hingegen mit einer erhöhten Synthese von Kollagen (Galera et al. 1992a). Entsprechend der Hypothese von Van der Kraan *et al.* scheint auch die GAG-Synthese in frisch isolierten, bovinen Chondrozyten durch TGF- $\beta$  eher inhibiert zu werden, währenddessen sie in dedifferenzierten Zellen durch die Zugabe von TGF- $\beta$  durchaus stimuliert wird (van der Kraan et al. 1992a, van der Kraan et al. 1992b). Trotz dieser Uneinigkeit steht außer Frage, dass TGF- $\beta$  in den Metabolismus von Knorpelgewebe eingreift und daher durchaus als potentiell Additivum für bioaktive Knorpelimplantate eingesetzt werden könnte.

### 2.4.3 Mesenchymale Progenitorzellen im Knorpel

Die Grundlage für eine endogene *In situ*-Regeneration von Knorpeldefekten ist die Anwesenheit von ortsständigen Zellen mit der Kapazität zur Proliferation und Matrixsynthese.

Aufgrund der geringen spontanen Selbstheilungskapazität galten ausgereifte Chondrozyten jedoch lange Zeit als einziger Zelltyp in erwachsenem hyalinen Gelenkknorpel, die im Falle einer notwendigen Gewebsreparatur nicht genügend aktiviert werden können.

Nachdem sich die Nutzung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark (*bone marrow-derived mesenchymal stem cells*, BM-MSC) im Bereich der Knorpelregeneration zunehmend etabliert hat, gelang es mittlerweile auch, pluripotente Zellen mit chondrogenem Differenzierungspotential in anderen gelenknahen Geweben wie Synovialmembran (De Bari et al. 2001, Fickert et al. 2003), infrapatellarem Fettkörper (Wickham et al. 2003) und Periost (Nakahara et al. 1991) zu identifizieren.

Unter Anwendung literaturbekannter MSC-Oberflächenmarker konnte die Existenz mesenchymaler Progenitorzellen (MPZ) mit chondrogenem, osteogenem und adipogenem Differenzierungspotential auch im Knorpel selbst nachgewiesen werden (Dowthwaite et al. 2004, Fickert et al. 2004). V.a. die gleichzeitige Expression von CD105 und CD166 erwies sich dabei als vielversprechende Markerkombination zur Identifizierung knorpelständiger MPZ (Alsalamah et al. 2004). Demnach besitzen etwa 3-5% aller Zellen im gesunden humanen Knorpel pluripotente Differenzierungseigenschaften. Im osteoarthrotischen Gewebe ist der Anteil ortsständiger MPZ sogar erhöht (Alsalamah et al. 2004, Hiraoka et al. 2006).

Die Kombination von chondroinduktiven Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 (Johnstone et al. 1998, Tuli et al. 2003), mechanischer Belastung (Angele et al. 2003) und räumlichem Kontakt zwischen knorpelständigen MPZ und ausdifferenzierten Chondrozyten (DeLise et al. 2000, Gurdon 1988) scheint ideale Bedingungen zur *In vivo*-Induktion einer chondrogenen Differenzierung zu bieten und könnte die Wahrscheinlichkeit einer fibrösen Fehl- bzw. Minderdifferenzierung der Progenitorzellen daher deutlich minimieren.

Das Vorkommen von MPZ in der Knorpelmatrix, also dem Zielort der Regeneration, macht diese Zellen zu einem höchst attraktiven Kandidaten für die angestrebte endogene Knorpeldefektheilung unter Anwendung zellfreier Implantate. Die genauere Untersuchung ihrer Häufigkeit und Lokalisation innerhalb der Knorpelmatrix sowie ihrer Regenerationskapazität stellt daher die Grundlage für alternative Behandlungsstrategien von degenerativen oder traumatischen Knorpelschäden dar.

### 3 PROBLEMSTELLUNGEN UND ZIELE DER ARBEIT

Bis heute existiert kein universell erfolgreiches Therapiekonzept zur Behandlung substantieller Defekte des Gelenkknorpels. Aus diesem Grund beschäftigt sich das BMBF-Verbundprojekt „BioInside“ mit der Entwicklung eines zellfreien und bioaktiven Implantates zur Deckung und Regeneration von Knorpeldefekten auf der Basis von BNC. Durch die Bindung bioaktiver Faktoren sollen ortsständige Zellen in das Implantat rekrutiert und zur Bildung von adäquatem Reparaturgewebe mit verbesserter *In situ*-Integration angeregt werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die prinzipielle Eignung unmodifizierter BNC als zellfreies Knorpelimplantat zu untersuchen. Dafür galt es, ein robustes *In vitro*-Modell zu etablieren, das die Langzeitkultur von Knorpelgewebe über mehrere Wochen unter Aufrechterhaltung von Gewebsintegrität und -homöostase ermöglicht und die frühen, initialen Stadien der Knorpelregeneration simuliert. Das Regenerationsmodell sollte universell für die standardisierte und vergleichbare Analyse zellfreier oder zellhaltiger Knorpelimplantate nutzbar sein. Als potentieller bioaktiver Faktor im Implantat wird aufgrund seiner chondroinduktiven und anabolen Wirkung der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 diskutiert. Daher sollte der Einfluss von TGF- $\beta$ 1 hinsichtlich Chondrozytenrekrutierung, -proliferation und Matrixsynthese unter den Bedingungen des Regenerationsmodells untersucht und sein konzeptioneller Beitrag zur Regenerationsförderung evaluiert werden.

Die konkreten Aufgabenstellungen sind im Folgenden zusammengefasst:

- Etablierung eines *In vitro*-Modells zur endogenen Knorpelregeneration im bovinen Gelenkknorpel und Evaluierung der Modellbedingungen bezüglich Aufrechterhaltung der Knorpelhomöostase in Langzeitkulturen von 2, 4 und 8 Wochen
- *In vitro*-Testung von unmodifizierter BNC +/- zusätzlicher TGF- $\beta$ 1-Stimulation
- Vergleichende Charakterisierung der kultivierten Knorpel-BNC-Regenerate bezüglich:
  - morphologischer Veränderungen der Knorpelintegrität,
  - Migrations- und Adhäsionsverhalten der Chondrozyten,
  - Matrixsynthese in BNC und Knorpel (PG/Aggrecan, Kol2, COMP, Kol1)
- Untersuchung der TGF- $\beta$ 1-Wirkung auf Rekrutierung und Proliferation humaner und boviner Chondrozyten
- Zellbesiedlung verschiedener Typen von modifizierter BNC

Die gewonnenen Erkenntnisse über das Migrationsverhalten ortsständiger Chondrozyten sollten die Basis für das gezielte Design eines Implantat-Prototyps aus BNC mit optimal modifizierter Porenstruktur für die anschließenden *In vivo*-Versuche bilden.



## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Ausführliche Liste der verwendeten Geräte

<b>Aesculap AG &amp; Co. KG, Tuttlingen, Deutschland</b>	Biopsiestanzen
<b>B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland</b>	Mikro-Dismembrator S
<b>BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland</b>	BD-FACscan™ Durchflusszytometer
<b>BINDER, Tuttlingen, Deutschland</b>	Wärmeschrank
<b>BMG LABTECH GmbH, Offenburg, Deutschland</b>	FLUOStar OPTIMA Multimode Microplate Reader
<b>Brand GmbH &amp; Co. KG, Wertheim, Deutschland</b>	Pipettierhilfe „accu-jet“
<b>Canon GmbH, Krefeld, Deutschland</b>	Digitalkamera Canon PowerShot A640
<b>Clean Air Technology SA, Lausanne, Schweiz</b>	Laminarbox
<b>EM Technologies Ltd., Ashford, England</b>	EMITECH K500 Sputter-Coater EMITECH K850 Kritischpunkttrockner
<b>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</b>	Mastercycler - „realplex2“ Multikanalpipette Thermomixer „comfort“ Transferpipetten (unterschiedliche Größen) Zentrifugen „5810 R“/ „5415 D“/ „5415 R“/ „minispin“
<b>Heidolph Instruments GmbH &amp; Co. KG, Schwabach, Deutschland</b>	Magnetrührer „MR 3001“ Taumeltisch „Polymax 1040“ Thermoschüttler „Unimax 1010“
<b>Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland</b>	HERAcell-Brutschrank für Zell- und Gewebekulturen
<b>Memmert GmbH &amp; Co. KG, Schwabach, Deutschland</b>	Wasserbad
<b>Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland</b>	MP 220 pH-Meter
<b>Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland</b>	HM 355 S Rotationsmikrotom HM 500 M Kryostat-Mikrotom
<b>Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA</b>	Cellometer® Auto T4
<b>Philips Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland</b>	XL-30 ESEM Rasterelektronenmikroskop

<b>Sartorius AG, Göttingen, Deutschland</b>	Waagen „KB BA 100“/ „BP 211D“/ „BL 600“
<b>Schubert &amp; Weiss GmbH, München, Deutschland</b>	steriles Sektionsbesteck (Skalpell, chirurgische Pinzette, spitze Schere)
<b>Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA</b>	Vortexer “Vortex Genie 2”
<b>Scotsman Ice Systems - Frimont S.P.A., Mailand, Italien</b>	Flockeneisbereiter AF80
<b>Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland</b>	Autoklav Systec V-120
<b>Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz</b>	HydroFlex™ Mikroplatten-Wascher (96-Well-Format)
<b>Thermo Shandon Electron Corporation, Waltham, MA, USA</b>	Gewebeeinbettautomat „Citadel 1000“ Spektrophotometer “NanoDrop ND-1000”
<b>Wheaton Science Products, Millville, NJ, USA</b>	Spinnerflasche
<b>Zeiss AG, Jena, Deutschland</b>	Digitalkamera „AxioCam HRC“ Konfokales Laserscanning-Mikroskop „LSM 510 Meta“ Mikroskop „Axiophot“ Mikroskop „Axiovert 25“ Software „AxioVision 3.1+4.0“

## 4.2 Ausführliche Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmittel

<b>Acris, Bad Nauheim, Deutschland</b>	monoklonaler Maus-anti-Human/Bovin Kollagen I-AK monoklonaler Maus-anti-Human/Bovin Kollagen II-AK
<b>BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland</b>	BD OptEIA™ Set Human TGF-β1 ITS™ Premix Universal Culture Supplement 15 ml/50 ml Röhrchen, BD Falcon™ 6-, 48- und 96-Loch-Mikrotiterplatten, BD Falcon™ FACS-Röhrchen, BD Falcon™ Zellkulturflaschen 12,5-225 cm <sup>2</sup> , BD Falcon™ Zellkulturschalen (verschiedene Größen), BD Falcon™
<b>Biowhittaker, Walkersville, MN, USA</b>	Fetales Kälberserum (FCS, hitzeinaktiviert)
<b>Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland</b>	Dako Pen Kaninchen-anti-Maus sekundärer AK (HRP-konjugiert) Kaninchenserum Maus IgG1-AK Proteinase K Ziegenserum Ziege-anti-Maus sekundärer AK (AP-konjugiert)
<b>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</b>	10xPuffer HotMT 96-Loch-PCR-Mikrotiterplatten HotMaster-Taq-DNA-Polymerase Reaktionsgefäße (0,5-2 ml)

<b>Euro-Diagnostica, Nijmegen, Niederlande</b>	Wieslab hCOMP ELISA
<b>Fresenius, Bad Homburg, Deutschland</b>	Ampuwa - Aqua inject.
<b>GeneTex Inc., Irvine, CA, USA</b>	monoklonaler Maus-anti-Human/Bovin Aggrekan-AK
<b>Gibco Invitrogen Corp., Karlsruhe, Deutschland</b>	DMEM/Nutmix F12 (1:1) Versene
<b>Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland</b>	sterile Einmalpipetten „Cellstar“ <sup>TM</sup>
<b>Hollborn &amp; Söhne GmbH &amp; Co KG, Leipzig, Deutschland</b>	Eosin-Lösung Hämatoxylin-Lösung Lichtgrün-Lösung Safranin-O-Lösung
<b>Ibex Pharmaceuticals Inc., Montreal, Kanada</b>	Kollagen Typ I und II Abbau-ELISA (C12C) Prokollagen II C-Propeptid ELISA (CPII) Aggrekan Chondroitin-Sulfat 846 Epitop ELISA
<b>Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland</b>	5xFirst Strand Puffer (250 mM Tris/HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,3) 10xBSA 10xPCR-Puffer (200 mM Tris/HCl, 500 mM KCl, pH 8,4) CellTracker <sup>TM</sup> Orange CMRA DTT (0,1 M) MgCl <sub>2</sub> (50 mM) Superscript II Reverse Transcriptase (200 U/μl) UltraPURE Agarose
<b>Kamiya Biomedicals, Seattle, WA, USA</b>	polyklonaler Kaninchen-anti-Human/Bovin COMP-AK
<b>MD Bioproducts, Egg, Schweiz</b>	Kollagen Typ II ELISA
<b>Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig, Deutschland</b>	Deckgläschen 24x50 mm Objektträger Silan-beschichtet
<b>Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland</b>	Ameisensäure Aquatex® Guanidiniumhydrochlorid Hemacolor® Kanadabalsam <i>para</i> -Formaldehyd Tween 20
<b>Miles Inc., Elkhart, IN, USA</b>	Tissue Tek Formen Cryomold® (1x1 cm)
<b>Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland</b>	Amicon Ultra 0,5 ml Zentrifugalfiltereinheiten, MWCO 3000
<b>Molecular Probes, Leiden, Niederlande</b>	SYBR® Green I

<b>Neuro Probe, Inc., Gaithersburg, MD, USA</b>	ChemoTx ® Disposable Chemotaxis System
<b>PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland</b>	Gentamicin
<b>PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland</b>	rekombinantes humanes TGF-β1
<b>QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland</b>	Proteinase K (für RNA-Gewinnung) RNase-freie DNase I RNeasy Micro Kit
<b>R&amp;D Systems, Wiesbaden, Deutschland</b>	PE-konjugierter monoklonaler anti-Human TGF-βRII-AK
<b>Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland</b>	Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) dNTP (10 mM) Kollagenase P Trypsin
<b>Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland</b>	Aceton Dimethylsulfoxid Wasserstoffperoxid Xylol
<b>Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Niederlande</b>	Tissue Tek® O.C.T.™ Tissue Tek® III Unikassetten
<b>Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland</b>	Ziege-anti-Kaninchen sekundärer AK (HRP-konjugiert, sc-2004)
<b>SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland</b>	1,9-Dimethylenblau
<b>Sigma-Aldrich AG, Taufkirchen, Deutschland</b>	Boviner nasaler Septumknorpel Chondroitinase A DTAF EDTA Iodacetamid <i>ortho</i> -Phenylendiamin-dihydrochlorid Pankreas-Elastase Pepsin Pepstatin A Pronase E Sigma Fast™ 3,3'-Diaminobenzidin-Tabletten Sigma Fast™ Fast Red TR/Naphtol AS-MX-Tabletten Trypanblau
<b>Thermo Fisher Scientific/Nunc, Wiesbaden, Deutschland</b>	F96 MAXISORB ImmunoPlate Petrischalen (verschiedene Größen)

Alle weiteren, nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) und Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

### 4.3. Ausführliche Liste der verwendeten Medien und Lösungen

<b>AEC-Substrat:</b>	4 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol in 1 ml DMF + 14 ml 0,1 M Acetatpuffer (210 ml 0,1 N Essigsäure + 790 ml 0,1 M NaAc-Puffer); pH 5,2; + 0,15 ml 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Chondrozytenmedium:</b>	DMEM/F12 + 5% FCS (v/v; hitzeinaktiviert) + Gentamicin (100 µg/ml)
<b>DMB-Assay-Natriumacetat-Puffer:</b>	0,05 M Natriumacetat; 0,05% Tween 20 in 500 ml Reinstwasser; pH 6,8
<b>DMB-Assay-GuHCl-Lösung:</b>	2,88 M Guanidiniumhydrochlorid gelöst in 0,05 M Natriumacetat-Puffer
<b>DMB-Reagenz:</b>	1,9-Dimethylenblau (16 µg/ml); 0,03 M Natriumformiat; 0,2% Ameisensäure; pH 6,8
<b>ELISA-Bikarbonatpuffer:</b>	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> in A. bidest.
<b>ELISA-Citratpuffer:</b>	2,1 g Zitronensäure/100 ml A. dest.; pH 4,8
<b>FACS-Puffer:</b>	PBS + 1% FCS (v/v; hitzeinaktiviert)
<b>Knorpelmedium:</b>	DMEM/F12 + 5% FCS (v/v; hitzeinaktiviert) + Gentamicin (100 µg/ml) + ITS-Supplement (1:1000 verdünnt = je 5 µg/ml Insulin und Transferrin, 5 ng/ml Selenensäure)
<b>Lysis-Puffer für RNA-Isolation:</b>	RLT-Puffer (aus RNeasy® Micro Kit) + 1% (v/v) Mercaptoethanol
<b>Phosphate-buffered saline (PBS):</b>	137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 8,09 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,38 mM K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
<b>Tris-buffered saline (TBS):</b>	0,05 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; pH 7,6
<b>Trypsin-Lösung (0,25%):</b>	Trypsin (2,5%); 1:10 in Versene verdünnt

#### **4.4 Knorpelgewinnung zur Chondrozytenisolierung**

##### **4.4.1 Präparation bovinen Knorpelmaterials**

Als Quelle bovinen Gelenkknorpels dienten Rinderkniegelenke, die wöchentlich von der lokal ansässigen Agrargenossenschaftsfleischerei Buchheim Crossen e. G. in Walpernhain bezogen wurden. Diese stammten von Schlachttieren der Rasse „Schwarzbunte“ im Alter von zwei bis drei Jahren. Der zunächst grob vom Muskelfleisch gereinigte Femur wurde fest in einen Kettenschraubstock eingespannt. Anschließend wurde das Präparationsgebiet großflächig mit unvergälltem 70%igem Ethanol desinfiziert. Dann erfolgte unter sterilen Kautelen die Eröffnung des Kniegelenkes mittels Querinzision des Weichteilmantels und der darunter liegenden Gelenkkapsel in Höhe des zuvor palperten Gelenkspaltes. Nach Durchtrennung der Patellarsehne (*Ligamentum patellae*) sowie der Seitenbänder (*Ligamentum collaterale mediale et laterale*) konnte das Kniegelenk in maximale Flexionsstellung gebracht und unter Sicht der tibiale Gelenkanteil mitsamt der Menisken, der Kreuzbänder und des umgebenden Weichteilmantels entfernt werden.

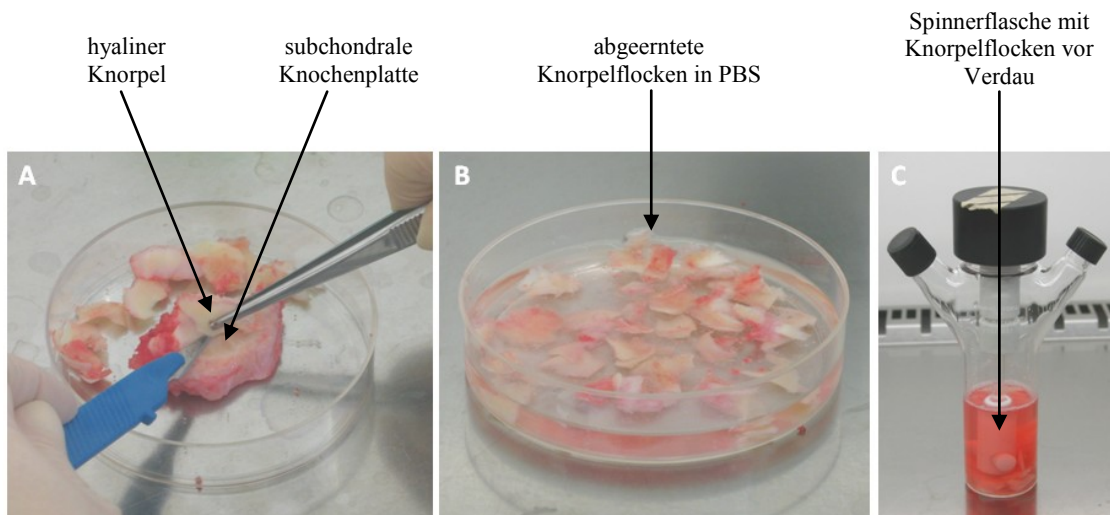
Für die Präparation des Gelenkknorpels wurden die seitlichen Areale der sich nun darstellenden Trochlea (*Facies patellaris femoris*) gewählt. Aufgrund häufiger arthrotischer Veränderungen erwiesen sich andere Lokalisationen wie etwa die Femurkondylen, das Tibiaplateau oder die trochleäre Mittelspalte bereits makroskopisch als nicht geeignet für die Knorpelentnahme. Nach Abschälung des Knorpels mittels Skalpell wurden die gewonnenen Gewebstücke bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C steril in PBS gelagert.

##### **4.4.2 Präparation humanen Knorpelmaterials**

Humanes Knorpelmaterial wurde im Rahmen von Gelenkersatz-Operationen gewonnen, die mehrmals wöchentlich in der Orthopädischen Klinik des Waldkrankenhauses „Rudolf-Elle“ in Eisenberg durchgeführt werden. Es handelte sich hierbei v.a. um gonarthrotisch veränderte Gelenke, die leitliniengerecht eines Gelenkersatzes bedurften. Die Patienten wurden im Vorfeld ausführlich aufgeklärt und erklärten sich mit der Verwendung des Zellmaterials für wissenschaftliche Zwecke einverstanden. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena genehmigt (Bearbeitungs-Nr. 1942-01/07). In der auf Seite I befindlichen Tab. 3 (Anhang) sind die klinischen und radiologischen Daten der humanen Gewebespenden zusammengefasst.

Die Gelenkfragmente wurden unmittelbar postoperativ in der Sterilwerkbank makroskopisch begutachtet. Der verwertbare hyaline Knorpel wurde mittels Skalpell und Pinzette von der

subchondralen Knochenplatte abgeschält (Abb. 7A) und einmal in PBS gewaschen (Abb. 7B). Aufgrund der stark verminderten Chondrozytenqualität in arthrotisch veränderten Knorpelgebieten wurden möglichst nur makroskopisch intakte Gelenkareale geerntet. Ebenso wurden die randständigen Bezirke mit Kontakt zur Synovialmembran aufgrund einer drohenden Fibroblastenkontamination gemieden.



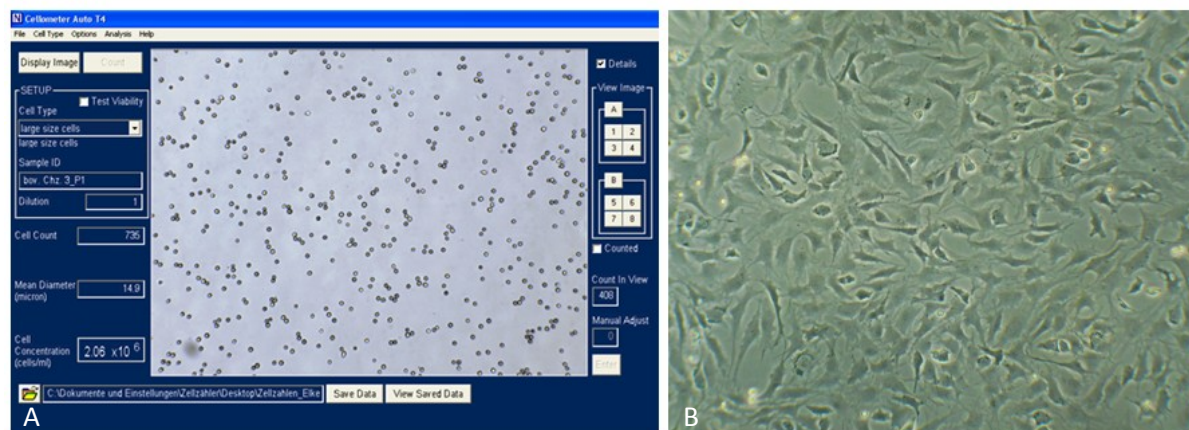
**Abb. 7: Präparation humanen Knorpelmateriails.** Der Knorpel wurde von der subchondralen Knochenplatte der Kniegelenksfragmente abgeschält (A), zerkleinert und durch Waschen in PBS von Blut und Resten der Synovialflüssigkeit getrennt (B). Zum Verdau der Matrix wurden die Knorpelflocken anschließend in eine Spinnerflasche überführt (C).

#### 4.4.3 Isolierung und Kultivierung boviner und humaner Chondrozyten

Zur Anlage von Monolayerkulturen als Voraussetzung für spätere Proliferations- und Chemotaxisassays war es notwendig, die bovinen bzw. humanen Chondrozyten mittels Matrixverdau aus ihrer extrazellulären Umgebung zu isolieren.

Die zuvor geernteten und zerkleinerten Knorpelstücke wurden mithilfe einer sterilen Pinzette in ein Verdaugefäß (Spinnerflasche) überführt (Abb. 7C). Im ersten Verdauschritt erfolgte eine Inkubation des Knorpelmateriails mit Pronase E (1 mg/ml) in serumfreiem Medium (DMEM/F12) für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde das Verdaumedium vollständig abgesaugt und die Knorpelstückchen zur möglichst restlosen Entfernung von Pronase E dreimal mit PBS gewaschen. In einem zweiten Schritt wurde der Knorpel mithilfe von Kollagenase P (0,1 mg/ml) in 5% FCS/DMEM/F12-Medium über Nacht (ü. N.) im Inkubator weiter verdaut. Um eine möglichst große Angriffsfläche für die Enzyme zu gewährleisten, fanden alle Verdauschritte unter kontinuierlicher Durchmischung mittels Magnetrührer statt.

Nach dem Aufschluss der Knorpelmatrix wurde der Ansatz mithilfe einer Pipette in ein Falconröhrchen überführt und für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, um das Zellmaterial auf dem Gefäßboden zu konzentrieren. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes, dreimaligem Waschen mit PBS und erneuter Zentrifugation erfolgte die Resuspension des Zellpellets in serumhaltigem Chondrozytenmedium. Zur Bestimmung der gewonnenen Zellzahl wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau (Lebend-/Totbestimmung) versetzt, in eine Einmalzählkammer gefüllt und automatisch im Cellometer (Abb. 8A) ausgezählt. Diese mikroskopbasierte, computergestützte Bildanalyse erlaubt eine schnelle, objektive und reproduzierbare Zählung eukaryotischer Zellen mit einer Größe von 5-60 µm. Entsprechend ihrer Zellzahl wurden die Knorpelzellen dann in Kulturflaschen ausgesät und unter Zugabe von Chondrozytenmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Bis zur Durchführung anschließender Versuche wurde eine Adhärenzzeit von mindestens 24 h eingehalten. Bei längerer Kultivierungsdauer wurde zur optimalen Zellversorgung dreimal wöchentlich ein Mediumwechsel durchgeführt.



**Abb. 8: Chondrozyten-Monolayerkultur.** (A) Bildschirmoberfläche nach Auszählung boviner Chondrozyten im Hellfeld mittels Cellometer®. (B) Adhärenente bovine Chondrozyten (P2) im Hellfeld.

Bei einer Zellkonfluenz von ca. 90% (Abb. 8B) konnten die Chondrozyten passagiert werden. Nach Absaugung des verbrauchten Mediums wurde der Monolayer zunächst zweimal mit PBS gewaschen, um die Chondrozyten vollständig von eventuellen Mediumrückständen und darin enthaltenen Trypsininhibitoren zu befreien. Danach wurden die adhärenenten Zellen für 5 min bei 37°C mit einer 0,25%igen Trypsinlösung inkubiert. Die vollständige Ablösung der Chondrozyten vom Kulturgefäßboden wurde anschließend unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach mehrfacher Spülung der Wachstumsfläche mit 10 ml einer 10%igen FCS/PBS-Lösung zur Neutralisierung der Trypsinaktivität konnte die Zellsuspension mittels Pipette in ein 50 ml-Falconröhrchen überführt und für 3 min bei 1200 rpm abzentrifugiert werden. Im

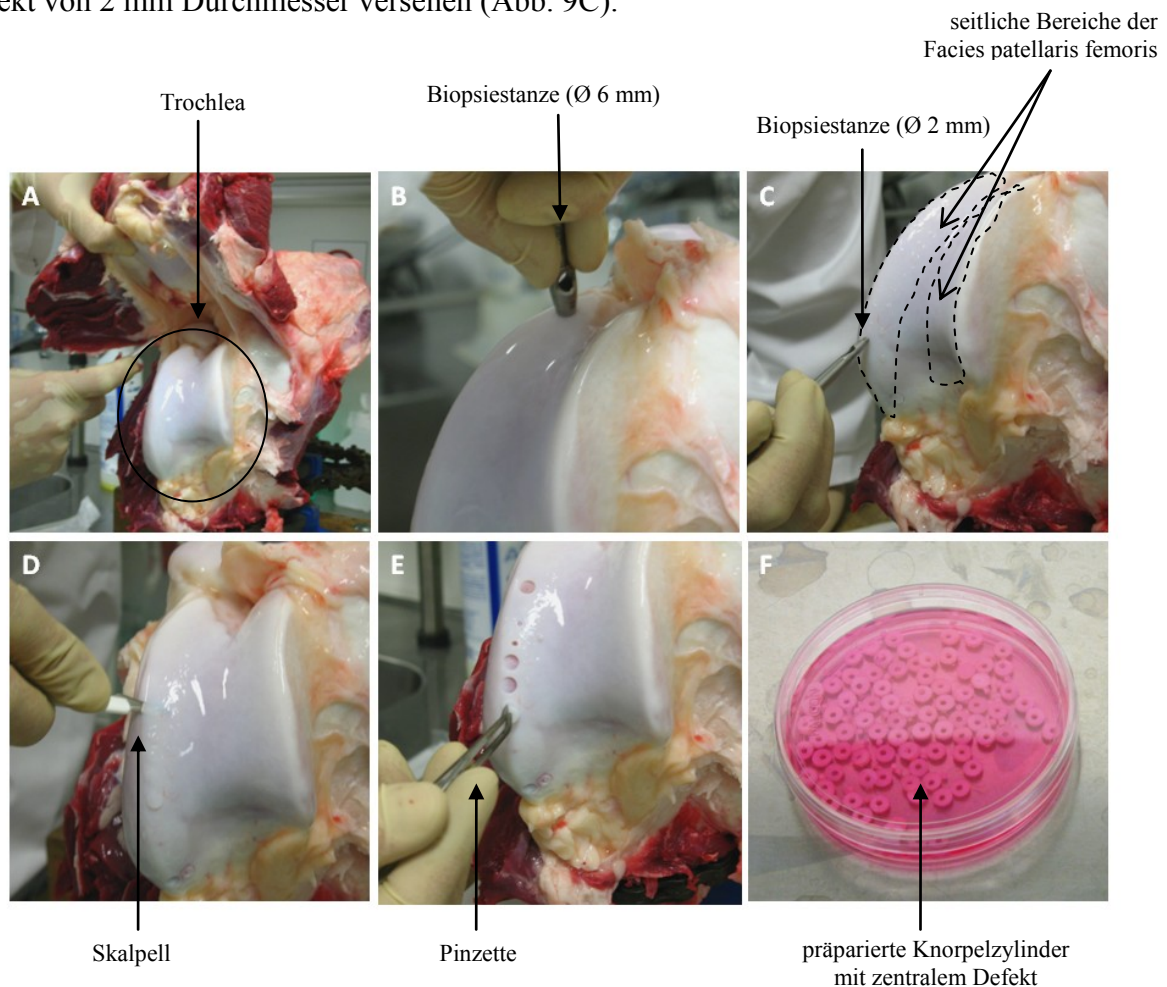


Anschluss folgte ein dreifacher Waschschrift mit 10% FCS/PBS. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 10 ml Chondrozytenmedium resuspendiert und entsprechend seiner Zellzahl in die nächstgrößere Kulturflasche ausgesät.

#### 4.5 Etablierung des *In vitro* – Regenerationsassays mit bakterieller Nanocellulose

##### 4.5.1 Gewinnung boviner Knorpelstanzen

Nach Eröffnung der Rinderkniegelenke (siehe 4.4.1; Abb. 9A) wurden für die Präparation der Knorpelstanzen ebenfalls die seitlichen Bereiche der *Facies patellaris femoris* gewählt. Mithilfe von Biopsiestanzen verschiedener Größen wurden kreisrunde Knorpelscheiben mit einem definierten Durchmesser von 6 mm ausgestanzt (Abb. 9B) und mit einem zentralen Defekt von 2 mm Durchmesser versehen (Abb. 9C).



**Abb. 9: Präparation der Knorpelstanzen aus einem bovinen Kniegelenk.** Nach Eröffnung des Gelenkraumes (A) mittels Querdurchtrennung der Patellarsehne und der Seitenbänder wurden mithilfe einer Biopsiestanze (Ø 6 mm) zunächst kreisrunde Knorpelscheiben in der *Facies patellaris femoris* vorgestanz (B) und mit einem zentralen Defekt (Ø 2 mm) versehen (C). Diese Zylinder wurden mit einem Skalpell in einer Tiefe von ca. 1 mm von den darunter liegenden kalzifizierten Knorpelschichten abtragen (D) und mittels Pinzette (E) bis zur Weiterverarbeitung in steriles Nährmedium (F) überführt.

Diese Zylinder wurden anschließend in einer Tiefe von etwa 1 mm mit einem Skalpell von der darunter liegenden kalzifizierten Knorpelschicht abgetragen (Abb. 9D) und mittels Pinzette in steriles Nährmedium überführt (Abb. 9E). Mit dieser Methode konnten bis zu 60 Knorpelscheiben pro Rinderknie gewonnen werden (Abb. 9F).

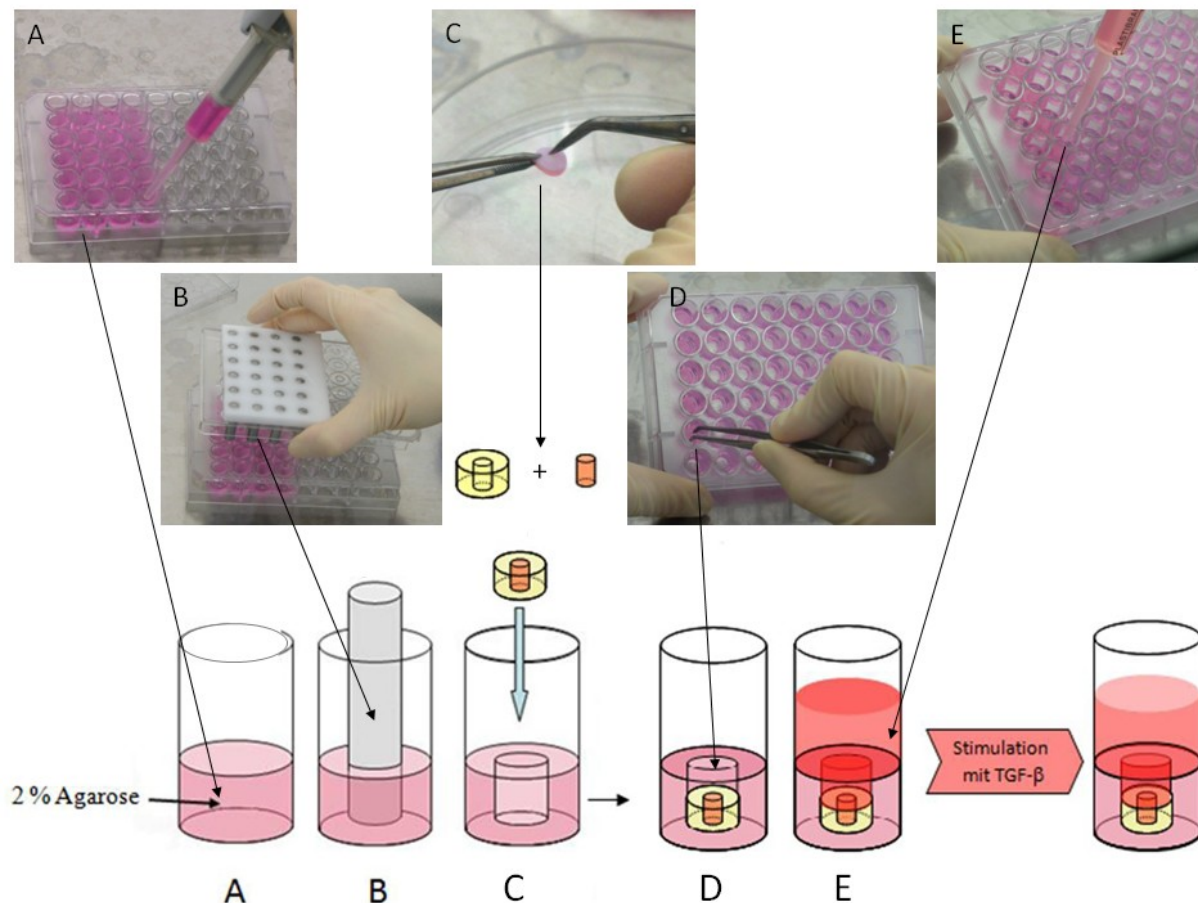
#### 4.5.2 Plattenherstellung

Jedes Loch einer 48-Well-Platte wurde mit 300 µl einer 2%igen Agaroselösung gefüllt, die zu gleichen Teilen aus PBS und Knorpelmedium bestand (Abb. 10A). Anschließend wurden die Stifte einer Metallstiftplatte jeweils zentral in die noch heiße Agarose getaucht (Abb. 10B) und erst nach deren Polymerisation wieder senkrecht entnommen. Dadurch entstanden zylinderförmige Vertiefungen mit einem definierten Durchmesser von 6 mm, in die die Knorpel-BNC-Konstrukte eingebettet werden konnten. Die Metallstiftkonstruktion wurde von der Zentralwerkstatt der FSU Jena eigens für das hier dargestellte Modell entwickelt und soll eine verlässliche Fixierung der Knorpelscheiben während der Kultivierung garantieren.

Die Firma Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG fertigte speziell für das *In vitro*-Modell BNC-Inserts in einem Zylinderformat von 6 mm Länge und 2 mm Durchmesser an. Nach Autoklavierung und Zuschnitt auf ca. 2 mm lange Cellulosestücke erfolgte die Füllung der zuvor gesetzten chondralen Defekte. Hierzu wurde der Innenkreis der präparierten Knorpelscheiben mittels Pinzetten passgenau mit BNC bestückt (Abb. 10C). Diese Konstrukte wurden anschließend in die vorgefertigten Agarosezylinder der Kulturplatte eingebettet (Abb. 10D) und mit 500 µl Knorpelmedium (Abb. 10E) überschichtet.

#### 4.5.3 *In vitro* – Kultivierung

Die bestückten Kulturplatten wurden für verschieden lange Zeiträume (2, 4 und 8 Wochen) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Um eine kontinuierliche Nährstoffversorgung des Knorpels zu gewährleisten, erfolgte dreimal wöchentlich ein Mediumwechsel in den einzelnen Kammern. Dazu wurden die Mediumüberstände vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt, asserviert und anschließend durch jeweils 500 µl frische Nährlösung ersetzt. Pro Kulturdauer wurden jeweils 96 Knorpel-BNC-Konstrukte aus den beiden Knien eines Tieres angesetzt, wobei je 48 Proben zusätzlich mit TGF-β1 im Medium (10 ng/ml) stimuliert wurden. Die andere Hälfte diente als Referenz und wurde mit basalem Knorpelmedium ohne TGF-β1-Stimulation versorgt.



**Abb. 10: Plattenherstellung und Einbettung der Knorpel-BNC-Konstrukte.** In die Löcher einer 48-Well-Platte wurde eine heiße, flüssige Agaroselösung (2%) gegeben (A). Durch Eintauchen einer Metallstiftplatte als Platzhalter (B) und deren Entnahme nach Verfestigung des Gels entstanden Agarosezylinder definierter Größe (Ø 6 mm). Die zentralen Defekte in den Knorpelstanzen wurden mittels Pinzette mit BNC bestückt (C). Anschließend konnten die Konstrukte in die Platten eingebettet (D) und mit Kulturmedium überschichtet werden (E). Bei 50% der Proben wurde dem Basismedium TGF- $\beta$ 1 in einer Konzentration von 10 ng/ml zugesetzt.

## 4.6 Histologische Analysen

### 4.6.1 Aufbereitung der Knorpel-BNC-Konstrukte für histologische und immunhistochemische Analysen

Nach Ablauf der Kulturdauer wurden je fünf Konstrukte pro Ansatz für histologische und immunhistochemische Zwecke aufgearbeitet. Das Medium wurde vollständig abgesaugt und der komplette Agarosezylinder jeweils einzeln mittels Spatel aus der 48-Well-Platte entnommen. Mithilfe eines Skalpell konnte die Agarose nun an den Seitenrändern aufgeschnitten und die gefüllten Knorpelscheiben freigelegt werden. Die Gewebeproben wurden zunächst für 48 h bei Raumtemperatur (RT) in 6%iger *para*-Formaldehyd-Lösung (PFA) fixiert, anschließend erfolgte ihre automatische Einbettung in Paraffin:

- Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 1 h (50%, 70%, 2 x 96%, 2 x 100% Ethanol) und im Anschluss für zweimal 4 h in frischem Xylol,
- Ersatz des in den Proben enthaltenen Lösungsmittels durch Überführung in reines geschmolzenes Paraffin für zweimal 3 h bei 60°C,
- Ausgießen der Präparate mit flüssigem Paraffin in TissueTek-Unikassetten,
- Auskühlen bei -20°C für mindestens 30 min.

Nach dem Erkalten wurden mithilfe eines Rotationsmikrotoms 6 µm dicke Schnitte gefertigt, auf einen Objektträger aufgeschmolzen und ü. N. bei 37°C getrocknet.

Vor den anschließenden Färbungen bedurfte es einer Deparaffinierung der Schnittpräparate. Dazu wurden die Objektträger zweimal für jeweils 15 min in Xylol überführt und im Anschluss in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 100%, 96%, 70%, 50% Ethanol) für je 10 min rehydriert. Nach einem letzten Waschschrift für 2 x 5 min in *A. dest.* konnten die Schnitte weiterverarbeitet werden.

#### **4.6.2 Histologische Färbungen**

##### Hämatoxylin-/Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-/Eosin (HE)-Färbung ist eine histologische Routinemethode zur allgemeinen lichtmikroskopischen Beurteilung von Gewebestrukturen. Die Paraffinschnitte wurden zunächst für 10 min bei RT in einer Hämatoxylin-Lösung gefärbt, anschließend unter fließendem Leitungswasser gewaschen und für weitere 10 min in Leitungswasser gebläut. Danach erfolgte eine Gegenfärbung mittels Eosin-Lösung für 3 min bei RT.

##### Safranin-O-/Lichtgrün-Färbung

Zur lichtmikroskopischen Darstellung des PG-Gehaltes der Regenerate wurden die luftgetrockneten Paraffinschnitte für 10 min in Safranin-O-Lösung gefärbt. Nach 3-fachem Waschen mit *A. dest.* erfolgte die Gegenfärbung der Präparate für 15 min mit Lichtgrün.

Die gefärbten Präparate wurden anschließend mit dem Xylol-löslichen Eindeckmedium Kanadabalsam luftfrei unter einem Deckgläschen eingedeckt.

#### **4.6.3 Immunhistochemische Färbungen**

Die quantitative Analyse der verschiedenen Regeneratproben bezüglich ihres Gehaltes von knorpelspezifischen Matrixbestandteilen und Dedifferenzierungsmarkern erfolgte mithilfe immunhistochemischer Färbungen für Aggrekan, COMP, Kol2 und Kol1.

Um den Bedarf an Antikörpern (AK) zu minimieren und das Abfließen von Inkubationslösungen zu verhindern, wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte zunächst eng mit einem Fettstift (Dako-Pen) umrahmt, anschließend für 5 min in frischer 4%iger PFA/TBS-Lösung fixiert und schließlich dreimal mit TBS gewaschen. Für die Detektion von Aggrekan und COMP erfolgte ein partieller Verdau der Knorpelmatrix durch Behandlung mit 0,25 U/ml Chondroitinase ABC für 90 min bei 37°C. Zur Darstellung von Kol1 und Kol2 wurden die Schnitte für 15 min bei RT mit Proteinase K (Verdünnung 1:50 in 0,05 M Tris-HCl; pH 7,5) inkubiert, was zur Freilegung der Epitope führte, die im Anschluss durch die spezifischen AK detektiert werden sollten. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die endogene Peroxidase-Aktivität des Probenmaterials durch 10-minütige Inkubation mit 0,5%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol abgesättigt und unspezifische Bindungsstellen mit 10% Serum/TBS für 30 min bei RT blockiert. Die hierzu verwendeten Sera stammten jeweils aus der gleichen Spezies wie der spätere Sekundär-AK. Danach wurden die Schnitte wiederum gründlich dreimal mit TBS gewaschen, mit jeweils 50 µl Primär-AK bzw. Isotypkontroll-AK überschichtet (Verdünnungen in Tab. 1) und bei 4°C ü. N. in einer feuchten Kammer inkubiert.

**Tab. 1: Übersicht über die für die immunhistochemischen Darstellungen verwendeten Primär-/Sekundär-AK/Substrat-Kombinationen mit den zugehörigen Isotypkontrollen.**

Antigen (verwendete Konzentration)	Klon	Isotyp	Sekundär-AK	Substrat
Anti-human/bovin-Kol1 (2 µg/ml)	COL-1	Maus IgG <sub>1</sub>	Kaninchen anti-Maus IgG-HRP	DAB
Anti-human/bovin-Kol2 (10 µg/ml)	II-4C11	Maus IgG <sub>1</sub>	Kaninchen anti-Maus IgG-HRP	DAB
Anti-human/bovin-COMP (50 µg/ml)	polyklonal	Kaninchen IgG	Ziege anti-Kaninchen IgG-HRP	AEC
Anti-human/bovin-Aggrekan (0,1 µg/ml)	MA85A95	Maus IgG <sub>1</sub>	Ziege anti-Maus IgG-AP	FastRed

Zur Entfernung überschüssiger, ungebundener AK folgte ein dreifacher Waschvorgang mit TBS. Anschließend wurden die Schnitte mit 50 µl *horseradish peroxidase-* (HRP-) bzw. alkalische Phosphatase- (AP-) konjugiertem Sekundär-AK bedeckt und erneut für 1 h bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriften wurde durch enzymatischen Umsatz eines zugegebenen Substrates unter Farbentwicklung der relative Gehalt an den spezifischen Matrixbestandteilen sichtbar gemacht. In der Peroxidasetechnik wurde als Substrat Diaminobenzidin (DAB; braune Farbreaktion) für die Kol1- und Kol2-Detektion bzw. 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC; rote Farbreaktion) für den Nachweis von

COMP verwendet. Zur Darstellung von Aggrekan diente der AP-abhängige Umsatz von FastRed (rosa Farbreaktion). Nach ausreichender Farbentwicklung (ca. 5-10 min) wurden die Schnitte nochmals mit TBS gewaschen und nach einer 5-minütigen Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin mit dem wasserlöslichen Eindeckmedium Aquatex® eingedeckt.

#### **4.6.4 Aufbereitung der Knorpel-BNC-Konstrukte für rasterelektronenmikroskopische Analysen**

Jeweils drei Proben pro Ansatz wurden für rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen präpariert. Die Entfernung der Knorpel-BNC-Konstrukte aus dem Agarosebett erfolgte analog zu 4.6.1. Anschließend wurden die Konstrukte für 72 h in 2% Glutaraldehyd in 0,2 M Cacodylatpuffer (pH 7,2) fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit Cacodylatpuffer wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 96%, 100% Ethanol) entwässert und bis auf weiteres in reinem Aceton gelagert. In der Kammer eines Kritischpunkttrockners wurde das Aceton anschließend restlos gegen flüssiges CO<sub>2</sub> ausgetauscht. Eine Erhöhung der Kammertemperatur bis auf 37°C führte zum Übertritt des CO<sub>2</sub> vom flüssigen in den gasförmigen Aggregatzustand, ohne die Knorpel-BNC-Struktur durch eventuell auftretende Oberflächenspannungen in irgendeiner Weise zu beeinträchtigen. Die getrockneten Proben konnten nun mittels Klebetabs auf Aluminiumtellern fixiert und im sog. Sputter coater unter Argon mit einer 20-40 nm dicken Goldschicht überzogen werden. Anschließend wurden die Objekte rasterelektronenmikroskopisch untersucht und bewertet.

### **4.7 Molekularbiologische Analysen**

#### **4.7.1 Aufbereitung der Knorpel-BNC-Konstrukte für molekularbiologische Analysen**

Zur Sicherung von Material für die Molekularbiologie wurde vor Beginn der biochemischen Proteinanalysen zunächst die RNA der Knorpelproben isoliert und erst anschließend eine Extraktion der im Knorpel befindlichen Proteine vorgenommen. Hierzu standen die verbliebenen 40 Proben pro Ansatz zur Verfügung.

Die Isolation von RNA ermöglicht eine Momentaufnahme der Zelltätigkeit, bei der nur aktuell in der Zelle transkribierte Gene als mRNA vorliegen. Die hinsichtlich der Knorpelregeneration interessierenden Gene waren hierbei Aggrekan und Kol2 sowie der Dedifferenzierungsfaktor Kol1.

Basierend auf einer postulierten Rekrutierung von Chondrozyten aus der Knorpelmatrix wurde zunächst versucht, die RNA aus folgenden Zellgruppen einzeln zu isolieren:

a) knorpelständige Chondrozyten, b) auf die Knorpelaußenseite migrierte Chondrozyten und c) auf oder in die BNC eingewanderte Chondrozyten. Die Separation der einzelnen Zellpopulationen sollte differenzierte Aussagen über die Syntheseaktivität der Chondrozyten an verschiedenen Orten der Regeneration ermöglichen.

Da RNA im Gegensatz zu DNA sehr instabil ist, muß die RNA in kürzester Zeit von degradierenden Enzymen (RNasen) getrennt werden. Das grundlegende Prinzip aller Isolationsmethoden beruht auf der Zelllyse und -weiterverarbeitung unter chemischen Bedingungen, die zu einer möglichst schnellen Denaturierung der RNasen führen. Anschließend wird die RNA von den übrigen zellulären Bestandteilen getrennt.

Aufgrund der zu erwartenden geringen Ausgangsmenge an Zellmaterial und den damit verbundenen kleinen RNA-Mengen wurden für die RNA-Isolation spezielle Reinigungssäulen verwendet („RNeasy Micro Kit“). Zusätzlich erfolgte eine Modifikation des Lysispuffers durch den Zusatz von carrier-tRNA (200 ng/ml), die einen Verlust von RNA durch unspezifische Bindung an die Gefäßwände verhinderte.

Zunächst wurden die Knorpelstanzen einzeln aus ihren Agarosezylindern entnommen und die BNC-Füllung mithilfe einer Pinzette aus den künstlichen Defekten entfernt. Je 10 Cellulosestücke wurden direkt in ein mit 300 µl RLT-Lysispuffer gefülltes, RNase-freies Eppendorfgefäß überführt und nach kurzem Vortexen bei -20°C eingefroren, wodurch die RNA der eventuell auf bzw. in der BNC befindlichen Zellen asserviert werden sollte. Die leeren Knorpelzylinder wurden in einem weiteren Eppendorfgefäß gesammelt, mit 600 µl Lysispuffer versetzt, für 1 min auf dem Vortexer inkubiert und wieder aus dem Eppendorfgefäß entnommen. Das Lysat wurde ebenfalls bei -20°C eingefroren. Auf diese Weise sollte die RNA der eventuell auf die Knorpelaußenseite migrierten Chondrozyten gewonnen werden. Die verbliebenen Knorpelscheiben wurden zur Entfernung von Lysatresten einmal mit PBS gewaschen und sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren, um sie bis zur Verarbeitung bei -70°C zu lagern.

#### **4.7.2 RNA-Isolierung**

##### **4.7.2.1 RNA-Isolierung aus den auf der Knorpelaußenseite bzw. auf der BNC befindlichen Chondrozyten**

Die bei -20°C gelagerten Lysate wurden nach dem Auftauen mit einem Vortexgerät gründlich durchmischt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von je 200 µl 70%igem Ethanol pro Zelllysate wurden die Proben einzeln in Aufreinigungssäulen (RNeasy MinElute

Spin Column) überführt und für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Dabei band die gesamte in der Probe enthaltene RNA an das Material der Säule, so dass das Eluat verworfen werden konnte. Nach Reinigung der Säule mit 350 µl Waschpuffer und anschließender Zentrifugation wurde die säulengebundene RNA für 15 min bei RT mit RNase-freier DNase I behandelt, um DNA-Kontaminationen zu vermeiden. Die Säule wurde erneut gewaschen und durch Zugabe und Abzentrifugation von 500 µl 80%igem Ethanol getrocknet. Die RNA wurde dann mit 14 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Evaluierung des Isolationsresultates erfolgte für jede Probe eine Bestimmung der mRNA-Konzentration mittels Extinktionsmessung in einem Nanodrop-Photometer (Absorptionsmaximum 260 nm).

#### **4.7.2.2 RNA-Isolierung aus knorpelständigen Chondrozyten**

Die gefrorenen Knorpelzylinder wurden mithilfe eines Mikro-Dismembrators zu feinem Knorpelmehl verarbeitet. Dafür wurde die Knorpelprobe in einen mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten, zweiteiligen Edelstahlschüttelbehälter gegeben und für 30 s bei einer Schüttelfrequenz von 2000 rpm und einer Schüttelamplitude von 16 mm von einer Chromstahlkugel (Ø 10 mm) zermahlen. Das gewonnene Knorpelpulver wurde anschließend in 600 µl Lysispuffer aufgenommen, gemischt und abzentrifugiert. Die Lysispufferüberstände wurden nach Zugabe von 1000 µl RNase-freiem Wasser und 15 µl Proteinase K (20 mg/ml) für 10 min bei 55°C im Thermomixer protokollgemäß angedaut, um Interferenzen mit unspezifischen Proteinen bei der Säulenaufreinigung zu vermeiden. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt und mit ihrem 0,5fachen Volumen 70%igem Ethanol versetzt. Die weitere RNA-Isolation mit dem RNeasy Micro-Kit erfolgte analog 4.7.2.1.

Alle nach der Säulenaufreinigung gewonnenen Eluate wurden ebenso wie das abzentrifugierte Knorpelpulver bei -70°C asserviert und für die spätere Proteinbestimmung genutzt.

#### **4.7.3 Synthese von cDNA mittels reverser Transkriptase**

Zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde die isolierte RNA mithilfe reverser Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben, um sie so für die lineare Amplifikation spezifischer Sequenzen durch die DNA-Polymerase zugänglich zu machen und die Expressionsstärke des untersuchten Gens zu bestimmen.

Je 12 µl Gesamt-RNA wurden mit 20 pmol Oligo-(dT)-Primer versetzt. Durch eine



Inkubation des Ansatzes für 10 min bei 70°C und eine anschließende Inkubation für 5 min auf Eis wurde die Denaturierung der RNA-Sekundärstruktur bewirkt. Die reverse Transkription erfolgte anschließend unter Zugabe von 4 µl 5 x First-strand-buffer, 2 µl DTT, je 25 mM dNTPs und 200 Units Superscript II reverse Transcriptase für 70 min beim Temperaturoptimum des Enzyms (42°C). Nach der Reaktion wurde die synthetisierte cDNA bei -20°C gelagert oder direkt für die PCR eingesetzt.

#### 4.7.4 Analyse der Genexpression mittels „real-time“-RT-PCR

Die „real-time“-RT-PCR ist eine Amplifikationsmethode für Nukleinsäuren, erlaubt aber gegenüber der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion zusätzlich die fortlaufende Quantifizierung der neu gewonnenen DNA. Diese wird mithilfe von Fluoreszenz-Messungen erreicht, die während eines PCR-Zyklus durchgeführt werden. Durch Zugabe des in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green war es somit möglich, im Verlauf der PCR die Menge der amplifizierten DNA als Maß für die ursprüngliche Menge des exprimierten Gens in der untersuchten Probe zu bestimmen. Durch die Mitführung einer Verdünnungsreihe des jeweiligen aufgereinigten PCR-Produktes in jedem Versuch gelang die Generierung einer Standardkurve, mit deren Hilfe sich die Ausgangskopienzahl des entsprechenden Gens in der Probe berechnen ließ. Die Spezifität der DNA-Vervielfältigung konnte schließlich mittels einer (an den letzten Amplifikationszyklus anschließenden) Schmelzkurvenanalyse sowie durch initiale Gelelektrophorese und Sequenzierung des Produktes gewährleistet werden.

Für die Genexpressionsanalyse wurden die umgeschriebenen cDNA-Proben der drei o.g. Zellpopulationen in Ansätzen von jeweils 20 µl Volumen untersucht. Jeweils 5 µl der cDNA-Probe bzw. des Standards wurden in eine 96-Loch-PCR-Microtiterplatte vorgelegt. Der Reaktionsansatz des Mastermixes enthielt je nach Probenanzahl das Vielfache von: je 0,5 µl der Primer (100 ng/µl); 2 µl 10xPuffer HotMT mit 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,8 µl BSA (100 ng/µl); 0,4 µl dNTP; 10,0 µl *A. bidest.*; 1 µl SYBR-Green (Verdünnung: 1:1250) und 0,3 µl HotMaster-Taq-Polymerase. Als Negativkontrolle diente in jedem Experiment die Mitführung von Wasser ohne cDNA.

Vor Beginn der eigentlichen Genexpressionsanalyse bezüglich der interessierenden Knorpelmarker galt es, den cDNA-Gehalt der einzelnen Proben auf ein etwa gleiches Niveau zu normalisieren. Dazu wurde der cDNA-Gehalt des von allen Zellen konstitutiv exprimierten Haushaltsgens Aldolase mittels „real time“-RT-PCR in allen Proben ermittelt. Durch die sich hierbei ergebenden Verdünnungsfaktoren gelang es schließlich, alle Proben auf einen nahezu

identischen Gehalt an cDNA einzustellen und anschließend bezüglich der Expression der Gene von Aggrekan, der  $\alpha 1$ -Kette des Typ II-Kollagens und der  $\alpha 2$ -Kette des Typ I-Kollagens zu untersuchen. Für alle drei in dieser Arbeit analysierten Gene konnte mit dem Primerbestand und den etablierten „real time“-RT-PCR-Protokollen der Arbeitsgruppe (Pretzel et al. 2009) gearbeitet werden (Tab. 4, Anhang Seite I).

#### **4.8 Biochemische Analysen**

Zur Analyse des Einflusses der mehrwöchigen Kulturzeit auf die Zusammensetzung und den Stoffwechsel der Knorpelmatrix wurden sowohl der kultivierte Knorpel selbst als auch die gesammelten Mediumüberstände auf den Gehalt an knorpelspezifischen Markerproteinen sowie Dedifferenzierungsmarkern untersucht. Durch die biochemische Analyse des Gehaltes bestimmter Matrixmarker gelang im Gegensatz zur Momentanalyse mittels PCR eine kumulative Erfassung während der gesamten Kulturdauer.

Die Mediumüberstände der einzelnen Ansätze wurden vorher wochenweise gepoolt und für verschiedene biochemische Analysen in kleineren Aliquots gelagert.

##### **4.8.1 Proteinextraktion aus dem Knorpel**

Sowohl aus den überschüssigen Lysateluaten nach RNA-Isolierung (4.7.2.2) als auch aus dem aufgeschlossenen Knorpelpulver der 2-, 4- und 8-Wochen-Kulturen wurden dazu alle Proteine extrahiert, um sie auf ihren Gehalt von knorpelspezifischen Markern zu untersuchen.

Die Isolierung denaturierter Knorpelproteine aus den Lysaten erfolgte nach dem etablierten Protokoll des verwendeten „RNeasy Micro Kits“ mittels Acetonpräzipitation. Dazu wurden die einzelnen Proben jeweils in ihrem vierfachen Volumen eiskaltem Aceton suspendiert und für 30-60 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Präzipitate für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und einer Geschwindigkeit von  $8000 \times g$  abzentrifugiert und die Acetonüberstände abgekippt. Die entstandenen Pellets wurden nach Lufttrocknung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zu ihrer Weiterverarbeitung eingefroren. Kurz vor Durchführung der biochemischen Analysen wurden die Pellets in jeweils  $700 \mu\text{l}$  eines  $50 \text{ mM}$  Tris-Puffer ( $\text{pH } 7,6$ ) aufgenommen und resuspendiert. Zur Vermeidung eines unspezifischen Proteinverdaus während der Inkubation durch im Knorpel enthaltene Enzyme wurde der Puffer zusätzlich mit verschiedenen Proteaseinhibitoren ( $1 \text{ mM}$  EDTA,  $10 \mu\text{g/ml}$  Pepstatin A,  $1 \text{ nM}$  Iodacetamid) versetzt.

Für die Proteinextraktion aus dem Knorpelpulver wurden die Proben in ihrem ca. 10-fachen Volumen  $4 \text{ M}$  Guanidiniumhydrochlorid ( $\text{GuHCl}$ ) in  $0,05 \text{ M}$  Natriumacetat ( $\text{pH } 6,0$ ) für

24-48 h bei 4°C auf dem Rolltisch inkubiert. GuHCl wirkt dabei als chaotropes Protein-Denaturierungsmittel. Die Lösung enthielt ebenfalls die o. g. Proteaseinhibitoren. Anschließend wurde die Suspension bei maximaler Drehzahl für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand konnte nun portionsweise auf Ultrafiltrationsröhrchen (MWCO 3000) überführt und für je 2 h bei 4°C und 4000 rpm filtriert werden, so dass der Proteinextrakt auf der Filtermembran konzentriert wurde. Nach einem Waschschrift mit 50 mM Tris-Puffer (pH 7,6) wurden die gebundenen Proteine mit 700 µl des 50 mM Tris-Puffer + Proteaseinhibitoren (pH 7,6) eluiert.

Für die anschließende Analyse des Gehaltes der jeweiligen Proteine wurde je Ansatz die extrahierte Proteinlösung aus dem Lysat und aus dem Knorpelpulver im Assay aufgetragen, vermessen und die Ergebnisse zu einer Gesamtkonzentration addiert.

#### **4.8.2 GAG-Bestimmung mittels DMB-Assay**

Die Freisetzung sulfatierter GAG aus dem Knorpel in den Mediumüberstand während der Kulturdauer sowie der verbliebene PG-Gehalt im kultivierten Knorpel wurden mithilfe des Dimethylenblau (DMB)-Tests bestimmt. Diese Methode beruht auf der Eigenschaft anionischer PG, den kationischen Farbstoff DMB zu binden.

Jeweils 50 µl der wochenweise gepoolten Mediumüberstände sowie der extrahierten Proteinlösungen aus Lysaten und Knorpelpulver wurden in Natriumacetatpuffer (0,05 M; pH 6,8) aufgenommen und in mehreren Verdünnungen (unverdünnt, 1:10, 1:100) in eine 96-Well-Mikrotiter-Platte pipettiert (Doppelbestimmung). Somit konnte gewährleistet werden, dass mehrere Messparameterpaare im linearen Bereich der mitgeführten Standardreihe aus bovinem nasalen Septumknorpel (BNS) lagen. Die Zugabe von jeweils 15 µl GuHCl-Lösung pro Loch verhinderte die spätere Messung anderer anionischer Moleküle (z.B. DNA) und sorgte für eine etwa 10-minütige Stabilisierung. Durch das anschließende Zupipettieren von 200 µl DMB-Reagenz pro Loch entstand ein Farbstoff-PG-Komplex. Die Absorption der Farbkomplexe wurde bei einer Wellenlänge von 525 nm im Spektrophotometer vermessen und verhielt sich direkt proportional zum enthaltenen GAG.

Zur Bestimmung der absolut freigesetzten GAG-Menge in den Kulturüberstand erfolgte die Hochrechnung des in 50 µl Überstand ermittelten GAG-Wertes auf die Gesamtmenge der jeweils über eine Woche gesammelten 1650 µl Medium pro Versuchsansatz. Im Vorfeld wurde ein mittleres Nassgewicht von ca.  $37 \pm 2$  mg pro Knorpelscheibe ermittelt und zur Berechnung der Absolutmenge GAG pro g Knorpelfeuchtgewicht (FG) herangezogen.

### 4.8.3 Bestimmung der Proteinexpression mittels ELISA

Die Konzentrationen bestimmter knorpelspezifischer Markerproteine im Knorpel und Kulturüberstand wurden mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Technik bestimmt.

Als ELISA wird ein immunologisches Nachweisverfahren bezeichnet, dessen Aussagekraft auf enzymatisch katalysierten Farbreaktionen basiert. Hierbei wird die Eigenschaft spezifischer AK genutzt, das nachzuweisende Antigen (AG) mit hoher Affinität zu binden. Zuvor wird entweder der AK oder aber das AG mit einem Enzym markiert und damit quantifizierbar gemacht. Ein adäquates chromogenes Substrat wird vom Enzym umgesetzt, wobei das Reaktionsprodukt üblicherweise durch Farbumschlag und spektrometrische Extinktionsbestimmung gemessen werden kann. Die Signalstärke ist eine Funktion der AG-Konzentration.

Für die quantitativen Analysen wurde eine Verdünnungsreihe des rekombinanten Proteins mit bekannten Konzentrationen mitgeführt. Aus der entstandenen Standardkurve konnte schließlich die Konzentration des AG in der untersuchten Probe berechnet werden. Außerdem wurde in allen durchgeführten Assays eine Probe des jeweiligen Verdünnungsmediums (ohne AG) als Leerwert mitgeführt, dessen Extinktion von den ermittelten Probendaten zur Berücksichtigung der unspezifischen Hintergrundabsorption abgezogen wurde. In allen folgenden Assays wurden die verwendeten Proben bzw. Standards in Duplikaten aufgetragen.

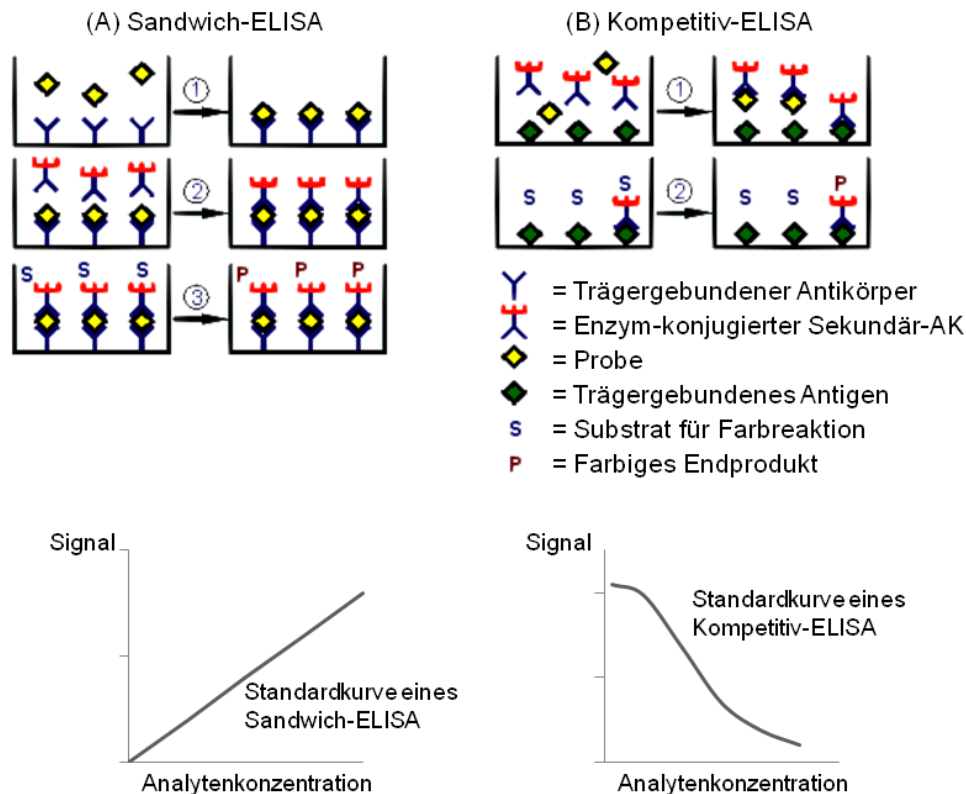
#### 4.8.3.1 Bestimmung von Kollagenfragmenten (CPII, C12C) und COMP

Der CPII-AK detektiert das C-Propeptid (CPII), welches während der Freisetzung von neu synthetisiertem Typ-II-Kollagen vom C-terminalen Ende des Prokollagens abgespalten wird. Der Gehalt des Aufbaumarkers korreliert direkt mit der Neosynthese von Kol2.

Der C12C-AK detektiert ein Neoepitop, das vorwiegend durch die Spaltung von Typ-II-, jedoch weniger von Typ-I-Kollagen durch Kollagenasen entsteht. Es befindet sich am C-Terminus des sog. „3/4 length“-Spaltproduktes des Kol2 und agiert als Abbaumarker bei extensiver Kol2-Destruktion.

COMP ist ein nichtkollagenes extrazelluläres Matrixprotein mit entscheidender Beteiligung an der Fibrillenformation im Knorpelgewebe. Im Falle traumatischer oder degenerativer Prozesse wird die COMP-Expression im Sinne eines Reparaturversuchs deutlich hochreguliert. Der verwendete hCOMP-ELISA zeigt nachgewiesene Kreuzreaktivität mit

bovinem COMP, so dass dessen Nachweis im Knorpel sowie im Mediumüberstand gewährleistet war.



**Abb. 11: Vereinfachtes Testprinzip eines Sandwich-ELISA (A) bzw. eines kompetitiven ELISA mit Festphasenanalyt (B) mit den zugehörigen Kalibrierungskurven.** Modifiziert nach [2].

Alle drei Tests funktionierten nach dem Prinzip eines kompetitiven Immuno-Assays und wurden nach ähnlichen Herstellerprotokollen durchgeführt (Tab. 2): Alle zu vermessenden Proben bzw. Standardlösungen wurden zunächst mit dem Anti-Neoepitop-AK auf einer separaten Mikrotiterplatte inkubiert, um die Bindung freien Neoepitops zu gewährleisten. Dieser AG-AK-Mix wurde schließlich auf eine vom Hersteller mit synthetischem Neoepitop-AG vorbeschichtete Platte aufgetragen. Noch freie Anti-Neoepitop-AK konnten nun an die gebundenen AG des Plattenbodens binden (Abb. 11B.1). Bei hohem Neoepitopgehalt der aufgetragenen Probe waren diese AK allerdings abgesättigt und banden daher nicht. Die ungebundenen Immunkomplexe wurden durch einen Waschschriff entfernt. Im Anschluss wurde zur Markierung gebundener AG-AK-Komplexe ein enzym-konjugierter Sekundär-AK zugegeben. Nach Umsatz eines zugegebenen adäquaten Substrates (Abb. 11B.2) konnte eine Farbentwicklung beobachtet werden, deren Absorption bei entsprechender Wellenlänge im Spektrometer vermessen werden konnte. Sie verhielt sich aus den oben genannten Gründen umgekehrt proportional zum Neoepitop-Gehalt der Probe.

Der CII- bzw. C12C-ELISA benutzte ein Peroxidase-gekoppeltes Detektionssystem. Die hierbei verwendete HRP oxidiert unter enzymatischer Degradation von Wasserstoffperoxid das farblose Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Endprodukt, welches durch Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure einen stabilen gelben Farbkomplex bildet, der bei 450 nm spektrophotometrisch vermessen werden kann.

Die im hCOMP-ELISA verwendete AP bewirkt die Abspaltung des Phosphat-Restes von seinem Substrat *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP). Die Akkumulation des Reaktionsproduktes *p*-Nitrophenol im Reaktionsansatz kann aufgrund seiner intensiven gelben Färbung bei einer Wellenlänge von 405 nm spektrophotometrisch detektiert werden.

**Tab. 2: Detaillierte Herstellerprotokolle für den CII-, C12C- und hCOMP-ELISA.** Alle Inkubationen fanden auf einem Plattenschüttler bei 600-700 rpm und soweit nicht anders angegeben bei RT statt. Volumenangaben in µl pro Well.

	CII	C12C	COMP
<b>Herstellung des AG-AK-Mixes</b>	50 µl Probe + 50 µl Primär-AK (1:120 verdünnt in Puffer II), 1 h	50 µl Probe + 50 µl Primär-AK (1:400 verdünnt in Puffer II), 30 min	75 µl Probe + 75 µl Primär-AK, 12-18 h, 4°C
<b>Inkubation auf vor-beschichteter Platte</b>	80 µl AG-AK-Mix, 2 h	80 µl AG-AK-Mix, 1 h	100 µl AG-AK-Mix, 1 h
<b>Waschschritt</b>	6-fach		3-fach
<b>Inkubation mit Sekundär-AK</b>	100 µl GAR-HRP-Konjugat (1:220 verdünnt in Puffer III), 30 min	100 µl GAR-HRP-Konjugat (1:500 verdünnt in Puffer III), 30 min	100 µl AP-Konjugat, 1 h
<b>Waschschritt</b>	6-fach		3-fach
<b>Substratzugabe</b>	100 µl TMB, 30 min		100 µl pNPP, 1 h
<b>Abstoppen</b>	100 µl 0,2 M Schwefelsäure		
<b>Absorptionsmessung</b>	450 nm		405 nm

#### 4.8.3.2 Bestimmung von Aggrekanfragmenten (CS846)

CS846 steht für ein Neoepitop auf CS-Seitenketten des Aggrekanmoleküls und gilt als Indikator für eine ausgeprägte Aggrekan-Neosynthese.

Der zur Bestimmung des CS846-Gehaltes verwendete ELISA-Kit basierte ebenfalls auf dem Prinzip eines kompetitiven Immuno-Assays. Die Mikrotiterplatte war hierbei von Herstellerseite allerdings nicht mit dem Neoepitop selbst, sondern mit einem gegen CS846 gerichteten Primär-AK vorbeschichtet. Im ersten Versuchsschritt erfolgte die Zugabe von je 50 µl Probe bzw. Standard pro Well. Gleichzeitig wurden diesem Ansatz je 50 µl Biotin-markiertes CS846-Neoepitop (1:120 verdünnt in Assay-Puffer) sowie 50 µl freie CS846-AK (1:120 verdünnt in Assay-Puffer) hinzugefügt und die Mikrotiterplatte für 2 h bei RT auf dem Plattenschüttler (600-700 rpm) inkubiert. Damit konkurrierten sowohl Biotin-markiertes

CS846 als auch unmarkiertes Neopitop aus der Probe um die Bindung am freien bzw. am plattengebundenen CS846-AK. Nach sechsfachem Waschen wurden jeweils 100 µl Streptavidin-HRP-konjugierter Sekundär-AK pro Well hinzugefügt und der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert. Dabei band Streptavidin-HRP an jedes gebundene Biotin-CS846. Dessen Anteil war bei hohem unmarkierten Neopitopgehalt der aufgetragenen Probe allerdings entsprechend gering, so dass ungebundenes Streptavidin-HRP durch erneutes sechsfaches Waschen wieder aus dem Ansatz entfernt wurde. Nach Zugabe von je 100 µl TMB-Substrat und Inkubation auf dem Plattenschüttler für 30 min bei RT bewirkte das noch verbliebene HRP die Oxidation von TMB zu einem blauen Reaktionsprodukt. Die Reaktion konnte durch Zugabe von je 100 µl 0,2 M Schwefelsäure abgestoppt werden, was wiederum in einem gelben Farbumschlag resultierte, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im Spektrometer vermessen werden konnte. Sie verhielt sich aus den oben genannten Gründen wiederum umgekehrt proportional zum Neopitop-Gehalt der Probe.

#### **4.8.3.3 Bestimmung des Gesamt-Kollagen-Typ II-Gehaltes**

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Immuno-Assays bedurften die Proben vor der Messung im Kol2-ELISA einer speziellen Präparation. Um die Kol2-Produktion der Zellen zu ermitteln, musste das enthaltene Kollagen zunächst unter sauren Bedingungen mittels Pepsin aufgeschlossen und bei neutralem pH weiter mit Pankreas-Elastase verdaut werden, um die polymeren Kollagen-Moleküle in monomeres Kollagen zu konvertieren.

Dazu wurde jede Probe mit 500 µl Startvolumen 0,05 M Essigsäure (pH 2,8-3,0) sowie 50 µl Pepsin-Lösung (1-10 mg/ml gelöst in 0,05 M Essigsäure) versetzt und unter mildem Schütteln bei 4°C ü. N. angedaut. Nach anschließender Zugabe von 50 µl 10xTBS wurde der pH mittels 1 N NaOH auf 8,0 eingestellt. Die Zugabe von 50 µl Pankreas-Elastase-Lösung (1 mg/ml gelöst in 1xTBS, pH 7,8-8,0) mit Inkubation bei 4°C ü. N. unter mildem Schütteln bewirkte den endgültigen Abbau verbliebener intra- und intermolekularer Crosslinks innerhalb von polymeren Kollagen-Molekülen. Abschließend wurden alle Proben bei 10 000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert und die Überstände zehnfach mit Assay-Puffer verdünnt.

Der nun durchgeführte Kol2-ELISA beruhte auf dem Prinzip eines direkten Doppel-AK-Sandwich-ELISAs. Der erste AK diente zur Festphasen-Beschichtung des Mikrotiterplattenbodens. Je 100 µl der vorbereiteten Proben und Standards wurden nun auf die mit Kol2-AK vorbeschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und für 2 h bei RT inkubiert. Während dieser Zeit band der an die Platte gebundene AK das in den Proben enthaltene Kol2.

Die Platte durfte dabei nicht geschüttelt werden. Nach sechsfachem Waschen zur Entfernung ungebundener Probenbestandteile erfolgte die Zugabe von je 100 µl eines biotinylierten Sekundär-AK-Konjugates (1:100 verdünnt in Konjugat-Diluent) und eine weitere Inkubation für 2 h bei RT. Zur Entfernung überschüssiger Konjugat-AK wurde die Mikrotiterplatte erneut sechsfach gewaschen. Anschließend konnten die entstandenen AK-AG-AK-Komplexe durch Zugabe von je 100 µl Streptavidin-HRP (1:100 verdünnt in HRP-Diluent) nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT detektiert und mittels Zufügen von je 100 µl chromogenem TMB-Substrat nach weiteren 20 min bei RT quantifiziert werden (blaue Farbreaktion). Die Reaktion wurde durch das Zuführen von jeweils 100 µl 1,0 N Schwefelsäure abgestoppt, wodurch sich wiederum ein stabiler gelber Farbkomplex bildete, dessen Extinktion bei 450 nm im Spektrometer vermessen werden konnte. Die Intensität der Farbe war dabei direkt proportional zur Konzentration des zu bestimmenden Kol2 in der Probe.

#### **4.9 Untersuchungen zum Wirkprofil von TGF-β1 im angewandten Modell**

##### **4.9.1 Durchflusszytometrische Analyse der Expression des TGF-β-Rezeptors II auf bovinen und humanen Chondrozyten**

Die Durchflusszytometrie (= FACS-Analyse, „*fluorescence activated cell sorting*“) ist ein relativ junges labortechnisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung und molekularen Charakterisierung intakter Zellen. Das Prinzip der Analyse beruht hierbei auf dem hydrodynamischen Transport von Zellen und deren optischer Vermessung beim Durchtritt durch einen Laserstrahl. Eine Zellsuspension wird in einem Hüllstrom verdünnt und nach anschließender Fokussierung in einer Sequenz von Einzelzellen im rechten Winkel an einer Lichtquelle vorbei geführt. Am Messpunkt dienen die Streuung des Anregungslichtes sowie die Anregung von fluoreszenten Markern der simultanen Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften der Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sideward Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns sowie der Menge an intrazellulären Vesikeln beeinflusst wird. Zusätzlich ist es möglich, bestimmte Moleküle auf der Oberfläche bzw. im Zytoplasma der Zellen mit spezifischen Fluorochrom-gekoppelten AK zu markieren und deren Emissionssignale nach Anregung in



einem definierten Wellenlängenbereich simultan zu detektieren, was die Informationsdichte der Analysemethode enorm erhöht.

Zur Bestimmung der Reaktionsfähigkeit boviner bzw. humaner Knorpelzellen gegenüber TGF- $\beta$ 1 wurden bovine ( $n = 3$ ) und humane ( $n = 6$ ) Chondrozytenproben nach Isolation aus dem Knorpel und fünftägiger Adhärenz in Kultur (P0-Stadium) bezüglich der Oberflächenexpression des membranständigen TGF- $\beta$ RII untersucht. Nach Gewinnung der adhärennten Zellen mittels Trypsinbehandlung (ausführlich beschrieben unter 4.4.3) wurden Zellzahlen von jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen pro FACS-Röhrchen eingestellt und die Chondrozyten zweimal mit je 500  $\mu$ l FACS-Puffer gewaschen, um Mediumüberstände möglichst restlos zu entfernen. Zwischen den Waschschritten erfolgte eine Abzentrifugation der Zellen bei 4°C und 1200 rpm für 3 min sowie ein Abkippen des Überstandes. Anschließend wurde in jedem FACS-Röhrchen ein Volumen von 25  $\mu$ l eingestellt, bevor die Fc-Rezeptoren der Chondrozyten für 15 min bei RT mit jeweils 1  $\mu$ g unmarkiertem Maus-IgG1 geblockt wurden. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 10  $\mu$ l eines Fluorochrom-konjugierten TGF- $\beta$ RII-AK (0,5  $\mu$ g/ $1 \times 10^5$  Zellen) bzw. des entsprechenden Isotyps. Zur Bestimmung der zellassoziierten Autofluoreszenz diente ein letzter Ansatz nur mit FACS-Puffer (ohne AK).

Der verwendete Farbstoff Phycoerythrin (PE) ist ein häufig eingesetztes Fluorochrom aus dem Photosyntheseapparat der Rot- und Blaualgen mit einem Absorptionsmaximum bei 488 nm und einem Emissionsmaximum für Fluoreszenzlicht bei 578 nm.

Um alle ungebundenen AK aus dem Ansatz zu eliminieren, folgte nach Ablauf der Inkubationszeit von 30 min bei 4°C im Dunkeln ein gründliches dreifaches Waschen und Zentrifugieren mit je 500  $\mu$ l FACS-Puffer. Die markierten Chondrozyten wurden abschließend in 500  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert. Die Messung und Auswertung erfolgte unter Nutzung des Durchflusszytometers BD-FACscan<sup>TM</sup> und der zugehörigen PC-Software „Cell Quest Pro“.

#### **4.9.2 TGF- $\beta$ 1-BrdU-Proliferationsassay boviner und humaner Chondrozyten**

Zur Bestimmung des spezifischen Einflusses von TGF- $\beta$ 1 auf die Proliferation humaner und boviner Chondrozyten wurden standardisierte BrdU-Proliferationsassays durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein kolorimetrisches Verfahren, das zur Quantifizierung des Zellwachstums als Standardmethode im Labor eingesetzt wird. Das Testprinzip beruht dabei auf dem Einbau des Pyrimidinanalogons Bromodesoxyuridin (BrdU) in die DNA aller während der Proliferation entstandenen Zellen. BrdU kann von der Zelle aufgenommen

werden und in phosphorylierter Form während der S-Phase des Zellzyklus das Nukleotid Desoxythymidintriphosphat (dTTP) ersetzen. Eine stattgefunden DNA-Synthese als direkter Ausdruck der proliferativen Aktivität der Zellen kann anschließend immunhistochemisch mittels spezifischer AK gegen BrdU nachgewiesen und über nachgeschaltete Reaktionen quantifizierbar gemacht werden. Entstehende Farbstoffe und die damit verbundene Absorption sind proportional zur Zahl der proliferierenden Zellen in der jeweiligen Kultur.

Bei der Durchführung des Assay wurde nach der Anleitung des verwendeten Kits „Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)“ vorgegangen:

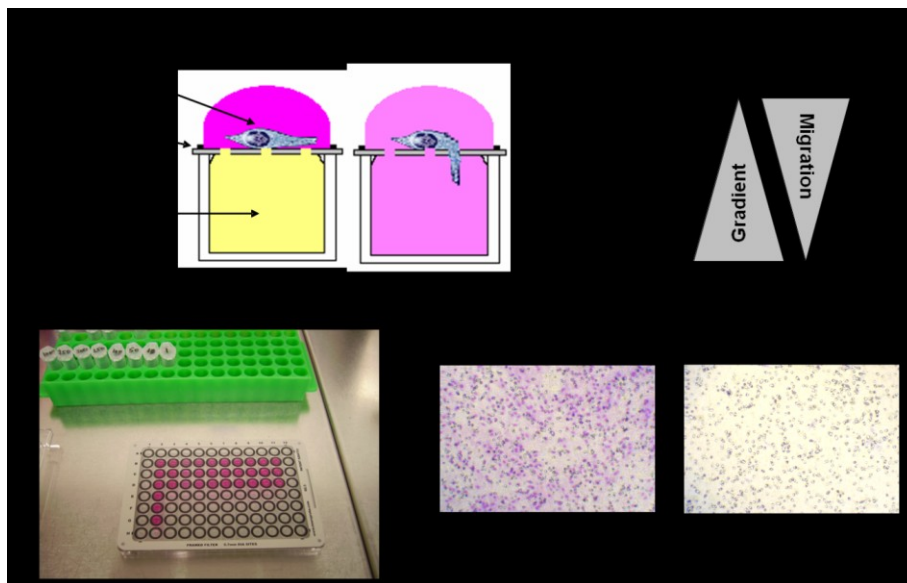
Jeweils 100 µl boviner (n = 4) und humaner (n = 8) Knorpelzellsuspensionen wurden mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/6 ml Vollmedium (5% FCS) in jedes Well einer 96-Well-Platte ausgesät (= 2000 Zellen/Well). Nach 24 h Adhärenzzeit bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Medium abgesaugt und durch jeweils 100 µl/Well eines Hungermediums (1% FCS) ersetzt. Mithilfe dieses sog. „Starvings“ war es möglich, die Chondrozyten reversibel im G1-Stadium des Zellzyklus zu arretieren und einen proliferationsfördernden bzw. kostimulierenden Effekt von FCS auszuschließen, der aus Vorversuchen ohne Starvingprozess bekannt war. Nach Ablauf der Starvingzeit von 48 h erfolgte die eigentliche Stimulierung der Zellen mit der interessierenden Testsubstanz TGF-β1. Dazu wurde ihnen jeweils in Sechsfach-Bestimmung TGF-β1-haltiges Hungermedium in verschiedenen Konzentrationen (0,01 - 0,1 - 1 - 10 - 100 ng/ml) zugesetzt. Nach einer Stimulationszeit von weiteren 48 h im Inkubator erfolgte durch die Zugabe von jeweils 10 µl/Well einer BrdU-Markierungsreagenz (10 µM BrdU) die Kennzeichnung aller im Versuchszeitraum neu gebildeten Zellen. Nach 18 h Einbauzeit des Pyrimidinanalogons wurde das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen für 30 min bei RT mit je 200 µl/Well einer alkoholischen Fixierungslösung (FixDenat) denaturiert. Die Denaturierung der DNA ist notwendig, um die Erreichbarkeit des inkorporierten BrdU für die Detektion mittels AK zu verbessern. Der Peroxidase-gekoppelte BrdU-AK (Anti-BrdU-POD) wurde nun 1:100 in einer entsprechenden AK-Verdünnungslösung aufgenommen, zu jeweils 100 µl/Well auf die fixierten Chondrozyten gegeben und für 90 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit band das Anti-BrdU-POD spezifisch an das inkorporierte BrdU der neu synthetisierten, zellulären DNA. Anschließend wurden die ungebundenen Reste des AK-Konjugates durch einen dreifachen Waschschrift mit PBS (je 200 µl/Well) entfernt und die gebundenen Immunkomplexe durch die Zugabe des Substrates TMB (je 100 µl/Well) detektiert. Der Substratumsatz fand bei RT statt und dauerte bis zum sichtbaren blauen Farbumschlag zwischen 5 und 30 min. Danach wurde die Reaktion mit 25 µl/Well 1 M Schwefelsäure abgestoppt, wobei sich ein stabiler gelber Farbkomplex bildete. Dieser wurde

anschließend durch die Messung der Absorption bei 450 nm (Referenzwellenlänge 690 nm) im Spektrophotometer quantifiziert. Die entstandene Farbintensität und die Höhe der damit verbundenen Absorptionswerte korrelierten direkt mit der Menge der DNA-Synthese und somit mit der Anzahl der proliferierenden Zellen in der jeweiligen Mikrokultur.

Als Negativkontrolle dienten Zellen nach einer Kultur in serumarmem Medium (1% FCS) ohne TGF- $\beta$ 1-Zusatz. Zur Korrektur der Messwerte hinsichtlich einer unspezifischen Bindung von BrdU am Boden der Mikrotiterplatte wurde in jedem Ansatz eine sog. „Blank“-Reihe ohne Zelleinsaat mitgeführt, deren Messwerte jeweils von den Absorptionen der Proben subtrahiert wurden. Zur Überprüfung einer unspezifischen Bindung von Anti-BrdU-POD an die Zelloberfläche wurde stets eine Hintergrundkontrolle ohne BrdU-Labeling vermessen.

#### 4.9.3 TGF- $\beta$ 1-Chemotaxisassay boviner und humaner Chondrozyten

Zur Klärung der Frage, ob die Rekrutierung von Chondrozyten aus der Knorpelmatrix durch den Zusatz von TGF- $\beta$ 1 spezifisch unterstützt werden könnte, wurden in Zusammenarbeit mit dem Kooperationspartner TransTissueTechnologies (Berlin) Chemotaxis-Assays mit humanen bzw. bovinen Chondrozyten (je  $n = 3$ ) durchgeführt. Hierzu wurden entsprechend eines etablierten Protokolls (Fiedler et al. 2002) kommerziell erhältliche 96-Transwell-Platten mit 8  $\mu$ m-Polycarbonat-Membranen verwendet (Abb. 12B).



**Abb. 12: Graphische Darstellung des Prinzips von Chemotaxis-Assays.** (A) Die auf die Oberseite des Transwelleinsatzes applizierten Zellen werden durch die chemoattraktive Wirkung des in der unteren Kammer befindlichen Faktors zur Migration durch die feinporige Membran angeregt. (B) Transwellplatte im 96-Lochformat; (C) Färbung der auf die Unterseite der Membran migrierten Zellen (Abb. mit freundlicher Genehmigung von TransTissueTechnologies).

In die obere Transwell-Kammer wurden 30 000 in 40  $\mu$ l serumarmem DMEM-Medium (0,01% Serum) suspendierte Chondrozyten ausgesät. Die unteren Kammern wurden mit je 35  $\mu$ l serumarmem DMEM-Medium mit TGF- $\beta$ 1 in unterschiedlichen Konzentrationen (0,001 - 0,01 - 0,1 - 1 - 10 ng/ml) gefüllt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Platten für 20 h bei 37°C. Durch die feinporige Membran zwischen den beiden Kammern entstand ein TGF- $\beta$ 1-Gradient zur Anlockung der oberflächlich applizierten Chondrozyten auf die Unterseite der Trennmembran (Abb. 12A). Nach Entfernung der nicht rekrutierten Zellen auf der Membranoberseite wurden die migrierten Chondrozyten auf der Unterseite der Membran in Ethanol/Aceton fixiert, mit Hemacolor® gefärbt und anschließend quantifiziert. Dies geschah durch mikroskopische Auszählung der gefärbten Zellen in drei repräsentativen Ausschnitten (Abb. 12C). Unterkammern ohne TGF- $\beta$ 1-Zusatz dienten als Negativkontrolle, während Medium mit 10% FCS in den unteren Wells als Positivkontrolle herangezogen wurde.

#### 4.9.4 TGF- $\beta$ 1-ELISA

Zum Vergleich mit den bei der Kultur verwendeten TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen wurde sowohl der endogene TGF- $\beta$ 1-Gehalt im kultivierten Knorpel als auch der TGF- $\beta$ 1-Eigengehalt der im vorliegenden Modell verwendeten humanen und fetal-bovinen Kultursera (je  $n = 3$ ) bestimmt. Hierfür stand ein handelsüblicher TGF- $\beta$ 1-Sandwich-ELISA zur Verfügung.

In einem ersten Schritt wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit 100  $\mu$ l Capture-AK/Well (1:250 verdünnt in Bikarbonatpuffer) beschichtet und ü.N. bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mittels 300  $\mu$ l 3%igem BSA/PBS für 1 h bei RT. Nach vierfachem Waschen mit PBS-T (PBS mit 0,05% Tween-20) wurden die Proben, Standards und Leerwerte (50mM Tris-Puffer) in Duplikaten mit einem Volumen von 100  $\mu$ l/Well aufgetragen und die Platte für 2 h bei RT inkubiert. Hierdurch wurde die Bindung von in der Probe enthaltenem TGF- $\beta$ 1 an die AK-tragende Festphase der Plattenbodens gewährleistet (Abb. 11A.1). Überschüssige Probenbestandteile wurden anschließend durch viermaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Durch Inkubation der entstandenen Immunkomplexe für 1 h bei RT mit je 100  $\mu$ l Detektor-AK/Avidin-HRP-Konjugat (1:250 verdünnt in 1%igem BSA/PBS) erfolgte deren enzymatische Markierung (Abb. 11A.2). Nach erneutem 8fachen Waschen zur Eliminierung ungebundener Sekundär-AK wurden 100  $\mu$ l des farblosen chromogenen Substrates *ortho*-Phenylendiamin (OPD; 30 mg gelöst in 15 ml Citratpuffer) pro Well aufgetragen. Die simultane Zugabe von Wasserstoffperoxid bewirkte die enzymatisch katalysierte Umsetzung von OPD zu 1,2-Diaminophenazin (DAP; Abb. 11A.3). Der intensiv-orangene Farbumschlag erfolgte im Dunkeln und wurde nach 20 min

durch Zugabe von 100 µl 2 N Schwefelsäure/Well abgestoppt. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 492 nm im Spektrophotometer gemessen. Die Intensität der Farbe war dabei direkt proportional zur Konzentration des zu bestimmenden TGF-β1 in der Probe. Durch Mitführung einer entsprechenden Standardreihe bekannter Konzentrationen konnten die Daten nach Abzug des Leerwertes in die TGF-β1-Konzentration der einzelnen Proben umgerechnet werden.

#### 4.10 Zellbesiedlung verschiedener Typen modifizierter BNC

Mit dem Ziel einer dreidimensionalen Besiedlung des Cellulosematerials mit gleichmäßig verteilten Chondrozyten wurden in enger Zusammenarbeit mit dem Produktionspartner Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG folgende Modifikationen zur Veränderung des Porendesign bzw. zur Vergrößerung der inneren BNC-Oberfläche entwickelt:

- Einsatz von Porogenen (Gelatine-, Paraffin-, „Microspheres“) als Platzhalter an der Grenzfläche zwischen Luft und Kulturmedium während der Biosynthese zur Schaffung mikroporöser Cellulose-Strukturen (Ahrem 2009),
- postmodifikative Laserbehandlung der BNC zur Schaffung dreidimensional ausgerichteter und das gesamte Implantat durchdringender Kanalstrukturen mit einem mittleren Durchmesser von 200 µm und einem Kanalabstand von 600 µm.

Zur Vorbereitung der anschließenden Zellbesiedlung wurden die Cellulose-Vliese zunächst in *A. dest.* autoklaviert und zur Vermeidung eines osmotischen Schocks für 24 h in Chondrozytenmedium äquilibriert. Im Anschluss wurden die Proben in den ihrem Durchmesser entsprechenden Vertiefungen von Zellkulturplatten ausgelegt und mit einem 2%igen Agarosegel am Gefäßboden fixiert. Bovine Chondrozyten wurden wie unter 4.4.3 isoliert und in einem Suspensionsvolumen von 1 ml ( Zelldichte zwischen  $2 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  pro ml) auf den Vliesen ausgesät. Nach einer initialen Sedimentation und Adhärenz von 1 h konnten die Proben vollständig mit Chondrozytenmedium überschichtet und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24 h bzw. 7 Tage kultiviert werden (statische Kultivierung). Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Ausgewählte Proben wurden direkt in die Zellsuspension überführt und unter ständigem Rühren in einer Spinnerflasche inkubiert (dynamische Kultivierung).

Nach Ablauf der Kultivierungszeit wurden die Proben entsprechend 4.6.1 und 4.6.4 für histologische und rasterelektronenmikroskopische Analysen aufbereitet.

Zur Vorbereitung fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen bedurfte es vor der Durchführung von Besiedlungstests einer Markierung der BNC und der Chondrozyten mit Farbstoffen unterschiedlicher Emissionsspektren. Die Vliese wurden daher zu Beginn der Versuche für 6 h in 1 ml Dichlorotriazinylaminofluorescein-Lösung (DTAF)/ 125 ml BNC (2,5 mg DTAF/ 1 ml 0,1M NaOH) äquilibriert und anschließend ü. N. dreimal mit sterilem A. dest. gewaschen. Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank mit einer 10 µM CellTracker™ Orange Dimethylsulfoxid-Lösung (DMSO) inkubiert. Nach einer Einwirkzeit von 45 min wurde die Färbelösung abgesaugt. Zur intrazellulären Aktivierung des Farbstoffs wurden die Zellen anschließend für mindestens 30 min bei 37°C mit DMEM/F12-Medium (5% FCS) überschichtet. Die Chondrozyten konnten nun wie oben beschrieben auf den Cellulose-Vliesen ausgesät werden. Nach der Kultivierung der Zellen wurden die Proben aus den Kulturplatten entnommen, in Cryomold-Formen überführt und in Tissue-Tek® eingebettet. Nach einem schonenden Einfrieren der Proben bei -70°C im Gefrierschrank wurden die Probenblöcke aus den Cryomold-Formen entfernt und im Kryostat-Mikrotom bei -28°C zu 10-20 µm dicken Schnitten verarbeitet. Diese wurden nach Anschmelzen auf Objektträger überführt und zur Vermeidung eines Ausbleichens des Signals mit Antifade-Reagenz eingedeckelt. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop.

#### **4.11 Graphische Darstellung und statistische Auswertung**

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels der Grafiksoftware SigmaPlot 10 (Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA). Alle Daten wurden dabei als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM) angegeben. Zur Korrelationsanalyse wurde der Test auf Spearman-Rang-Korrelation herangezogen. Auf eine statistische Bewertung der quantitativen Analysen aus dem Regenerationsmodell wurde verzichtet, da zur initialen Modelletablierung bewusst für jeden Kulturzeitraum gepooltes Knorpelmaterial aus ein und demselben Tier verwendet wurde, so dass nicht von unabhängigen Proben ausgegangen werden kann. Zur Prüfung von Datenunterschieden aus den Experimenten mit höherer Individuenzahl wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet (Signifikanzniveau  $p \leq 0,05$ ). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Software SPSS 16.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 *In vitro*-Regenerationsassay

#### 5.1.1 Lichtmikroskopische Darstellung der kultivierten Knorpel-BNC-Konstrukte

Wie unter 4.5 beschrieben wurden bovine Knorpelzylinder mit einem zentralen Defekt versehen, mit BNC befüllt und für 2, 4 oder 8 Wochen mit und ohne zusätzlicher TGF- $\beta$ 1-Stimulation kultiviert.

Zur Beurteilung der Zellvitalität, Knorpelintegrität und Struktur der Defektränder sowie des Migrationsverhaltens der Chondrozyten wurden vertikale und horizontale Paraffinschnitte der kultivierten Konstrukte angefertigt, mit HE gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch begutachtet.

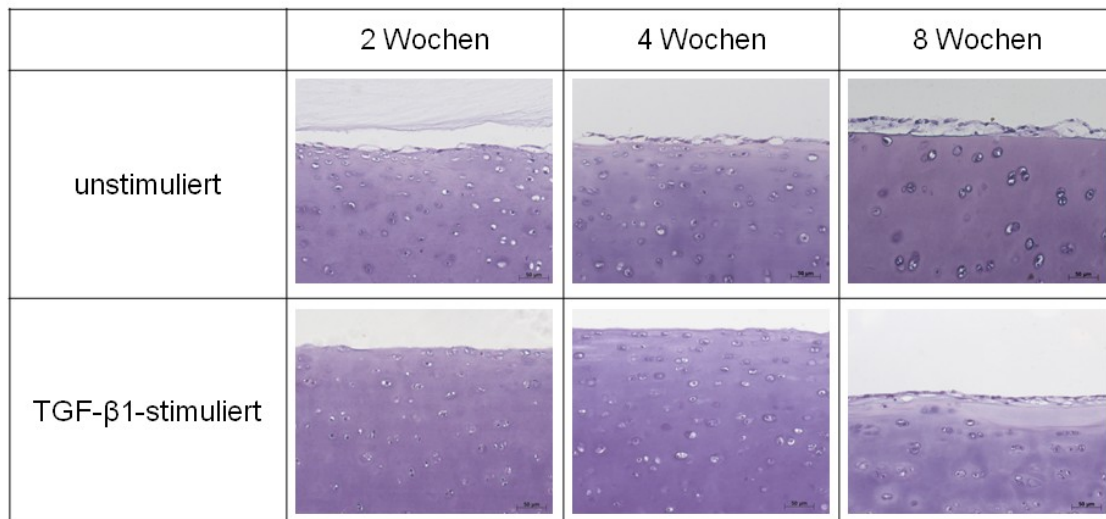
Durch Implantation der BNC konnte eine dichte Defektfüllung erreicht werden. Die Quellungsfähigkeit des Materials ermöglichte ein passgenaues „*Bonding*“ mit den Defekträndern des Knorpels.

Trotz der mehrwöchigen Gewebekultur zeigten sich keine Hinweise auf eine verminderte Zellvitalität. Anhand einer positiven Kernfärbung nahezu aller Chondrozyten konnte gezeigt werden, dass die Kulturbedingungen des *In vitro*-Modells von den Knorpelzellen gut toleriert wurden und die Vitalität des Gewebes nicht negativ beeinflussten. Als histologisches Korrelat einer eher unkontrollierten Chondrozytenproliferation zeigte sich schon in den frühen Kulturphasen die Bildung sog. „Brutnester“ (Zellcluster) in den defektnahen Randbereichen des Knorpels (Abb. 13).



**Abb. 13: Reaktionsmuster der Chondrozyten auf die initiale Defektsetzung.** Dargestellt ist ein Horizontalschnitt durch eine Knorpelscheibe nach 2-wöchiger Kultur. Durch eher unkontrollierte Proliferation der Chondrozyten nahe der Traumazone entstanden sog. Zellcluster. Originalvergrößerung: 200x.

Die Knorpelintegrität wurde über den gesamten Kulturzeitraum zufriedenstellend aufrecht erhalten. Lediglich die superfizielle Schicht des Knorpels löste sich mit steigender Kulturdauer v.a. in den unstimulierten Proben progredient von den darunterliegenden Gewebeschichten ab, was mit einer Demaskierung der tiefer liegenden Matrix einherging. Die zusätzliche Stimulation des Knorpels mit TGF- $\beta$ 1 schien diese Prozesse deutlich zu verlangsamen, so dass die oberflächliche Delamination in den TGF- $\beta$ 1-stimulierten Proben erst nach 8 Wochen erstmals lichtmikroskopisch sichtbar wurde (Abb. 14).



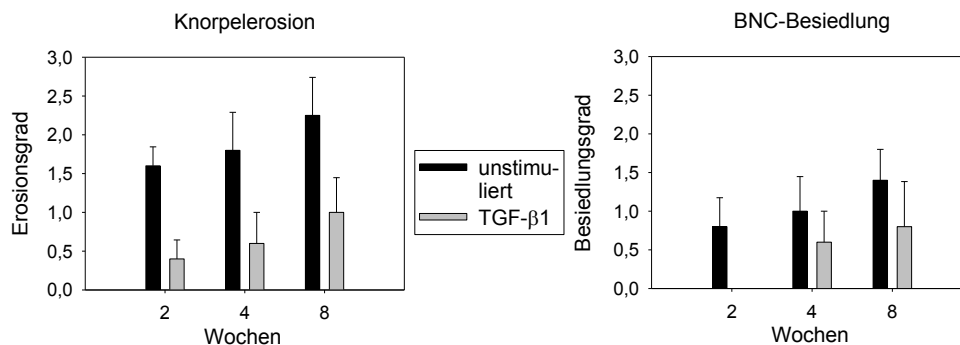
**Abb. 14: Lichtmikroskopische Darstellung der Knorpeloberfläche nach Kultur im Regenerationsmodell.** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von unstimulierten bzw. TGF- $\beta$ 1-stimulierten Proben nach einer Kultur von 2, 4 bzw. 8 Wochen. HE-Färbung, Originalvergrößerung: 200x.

Auch die semiquantitative Analyse ergab zumindest für die frühen Kulturphasen einen numerisch höheren Erosionsgrad in den unstimulierten als in den mit TGF- $\beta$ 1-stimulierten Proben (Abb. 15).

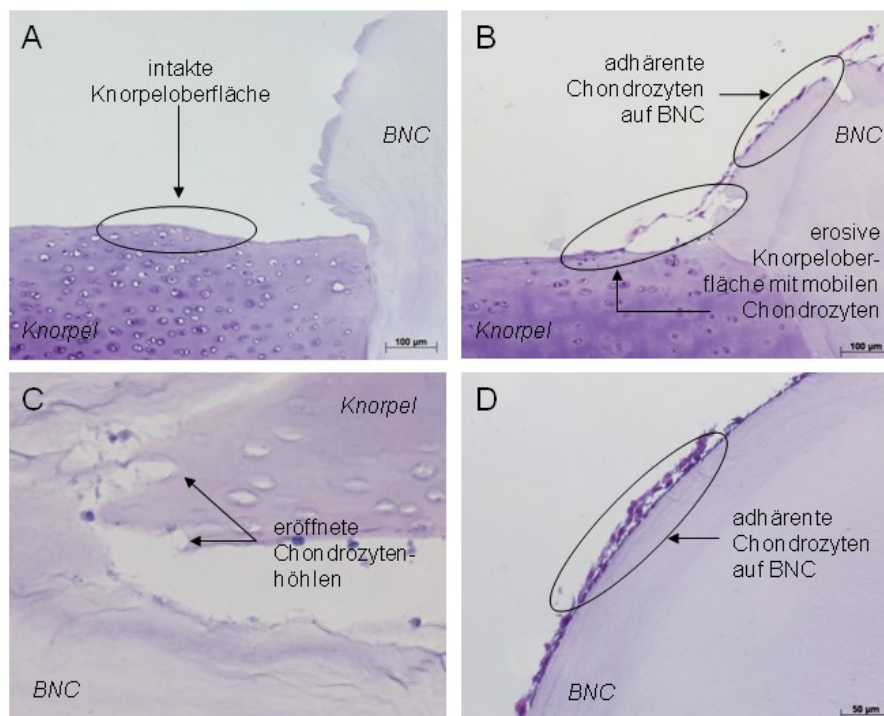
Interessanterweise war im Kulturverlauf ein deutlicher Zusammenhang zwischen oberflächlicher Knorpelerosion und Zellmigration zu beobachten. Bei intakter Knorpeloberfläche, wie sie vornehmlich in den TGF- $\beta$ 1-stimulierten Proben ersichtlich war, präsentierte sich die BNC trotz mehrwöchiger Kultur völlig zellfrei (Abb. 16 A). Mit zunehmender Oberflächenerosion und damit einhergehender Zellmobilisierung wurde jedoch eine progrediente Besiedlung des Implantatmaterials mit Chondrozyten beobachtet (Abb. 16 B). Durch die superfizielle Matrixdelamination während der Kultivierung scheinen oberflächlich liegende Chondrozytenhöhlen eröffnet worden zu sein (Abb. 16 C), so dass die Zellen aus ihrer Ummauerung im Knorpelgewebe in das Kulturmedium freigesetzt wurden, auf die BNC-Oberfläche auswanderten und dort z.T. flächig adhärirten (Abb. 16 D). Ein



Einwandern der Chondrozyten in tiefere Celluloseschichten bzw. eine dreidimensionale Besiedlung des Implantates wurde allerdings nicht beobachtet.



**Abb. 15: Semiquantitative Analyse von Knorpelerosion und BNC-Besiedlung.** Die Schnitte der fünf histologischen Proben jeder Versuchsgruppe wurden mit einer Punktzahl von 0 bis 3 bewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Legende: Erosionsgrad 0 = Knorpeloberfläche glatt, 1 = aufgeraute Lamina splendens, 2 = mäßige Delamination mit Auflockerung der oberflächlichen Matrix, 3 = massive Erosion mit Abtragung der oberflächlichen Matrix; BNC-Besiedlung 0 = BNC völlig frei von Zellen, 1 = Adhärenz vereinzelter Zellen ( $\leq 5$ ), 2 = vermehrte Adhärenz von Zellen ( $\leq 20$ ), 3 = streckige BNC-Besiedlung, auch mehrlagig.



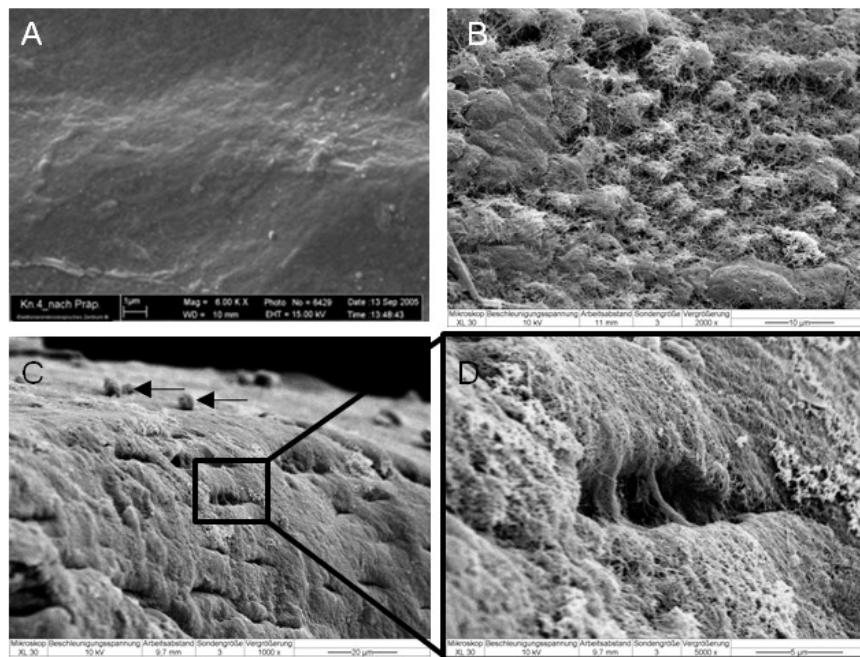
**Abb. 16: Zusammenhang zwischen Knorpelintegrität und Migrationsverhalten der Chondrozyten nach *In vitro*-Kultur mit (A) und ohne TGF-β1 (B-D).** Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von Knorpel-BNC-Regeneraten nach einer Kultur von 8 Wochen (HE-Färbung). Originalvergrößerung: (A) und (B) 100x, (C) 400x.

Der nach mikroskopischer Beurteilung der Schnitte entstandene Zusammenhang zwischen Erosionsgrad und BNC-Besiedlung mit Zellen wurde wiederum in der semiquantitativen Analyse dieser beiden Parameter bestätigt. Mit zunehmendem Erosionsgrad stieg in beiden

Versuchsgruppen auch die Anzahl der ausgewanderten und auf der BNC adhärenen Zellen (Abb. 15). Der Zusammenhang wurde durch eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Knorpelerosion und dem Ausmaß der BNC-Besiedlung belegt (Rangkorrelation nach Spearman,  $n = 3$ ;  $\rho = 1.0$ ;  $p < 0.01$ ).

### 5.1.2 Morphologie der Knorpel-BNC-Regenerate im REM

Die Effekte der Langzeitkultur-Bedingungen auf die Knorpel-BNC-Konstrukte wurden außerdem mittels der Rasterelektronenmikroskopie (REM) dargestellt. Neben der Beurteilung der Knorpelstruktur wurde der Fokus wiederum besonders auf die Besiedlung der BNC mit rekrutierten Chondrozyten gelegt. Grundsätzlich konnten die Ergebnisse der Lichtmikroskopie auch rasterelektronenmikroskopisch bestätigt werden.



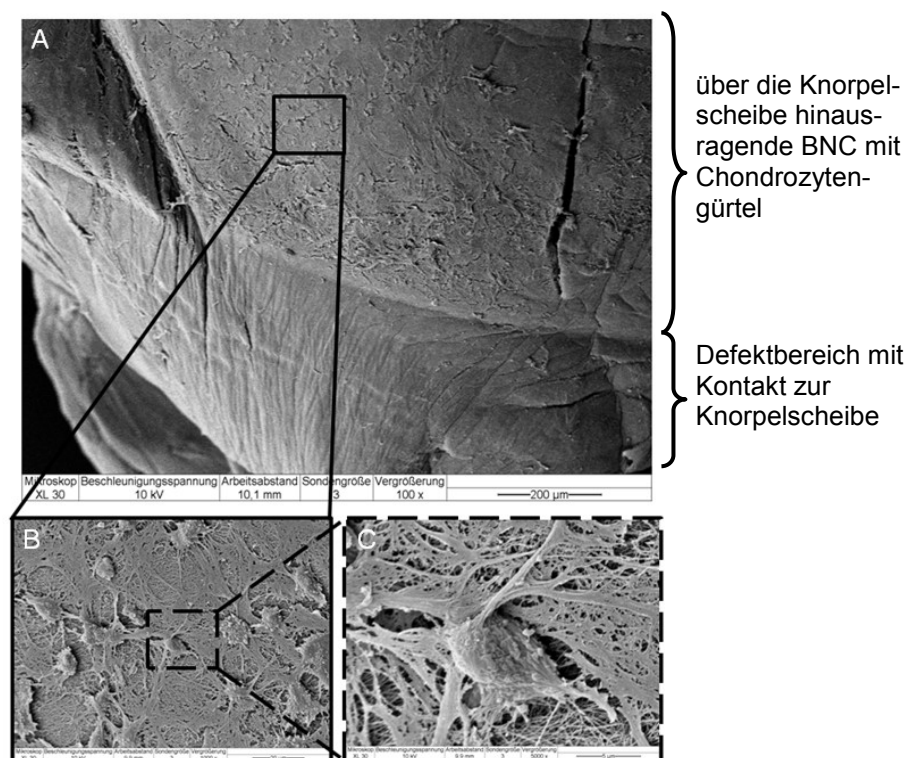
**Abb. 17: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung verschiedener Knorpeloberflächen.** (A) frischer Knorpel direkt nach der Präparation. (B)-(D) unstimulierte Knorpelprobe nach 8-wöchiger Kultur: (B) Die Knorpeloberfläche erscheint aufgeraut und unregelmäßig. Stellenweise wird durch Ablösung und Degradation der Lamina splendens das darunterliegende Netzwerk aus Kollagenfibrillen sichtbar. (C) Aus der Matrix mobilisierte, sphärische Chondrozyten auf der Knorpeloberfläche (←). (D) Eröffnete, leere Chondrozytenhöhlen. Originalvergrößerungen: (A) und (B) 2000x, (C) 1000x, (D) 5000x.

Frisch präparierter Knorpel wies eine gleichmäßige, intakte Oberfläche auf (Abb. 17 A). Diese äußere, zellfreie Schicht der EZM wird als *Lamina splendens* bezeichnet und bestimmt durch ihre Bestandteile (fibrilläre Elemente, Proteine wie Lubricin, Phospholipide) maßgeblich die Gleiteigenschaften des Knorpels. Mit steigender Kulturdauer zeigten sich v.a.

in den unstimulierten Proben zunehmende Unregelmäßigkeiten der Knorpeloberfläche. Durch die REM-Untersuchung gelang es, die progrediente Ablösung der *Lamina splendens* als ursächlich für diese oberflächliche strukturelle Matrixerosion nachzuweisen.

Der Abbau und das zunehmende Fehlen dieser Mucoproteinschicht im Laufe der *In vitro*-Kultur stellte den initialen Schritt zur Freilegung und Demaskierung der darunterliegenden Knorpelmatrix mit ihrem charakteristischen Netzwerk aus Kollagenfibrillen dar (Abb. 17 B). Durch den punktuellen Kollaps des Kollagengerüsts an einzelnen Stellen kam es zur Eröffnung von Chondrozytenhöhlen, wodurch die Mobilisierung von Knorpelzellen aus der sie fest umgebenden Matrix ermöglicht wurde (Abb. 17 C und D).

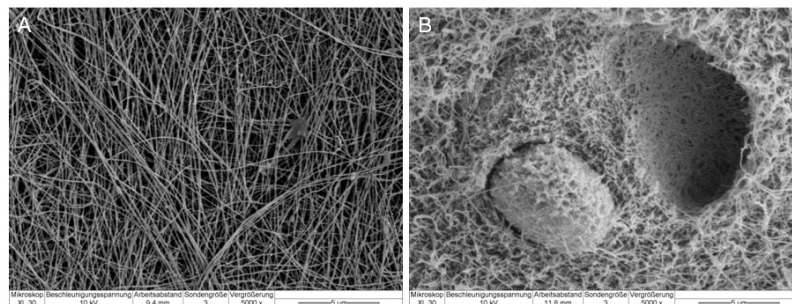
Mobilisierte Chondrozyten wurden weniger in den 2- und 4 Wochen-Kulturen, vermehrt jedoch in den Langzeitkulturen (8 Wochen) beobachtet, wobei hier aufgrund der geringeren Probenanzahl in der REM-Analyse kein Unterschied zwischen unstimulierten und TGF- $\beta$ 1-behandelten Proben beobachtet wurde. Die Zellen adhärten fest auf dem Celluloseuntergrund, ohne dabei tiefer in das Fasernetzwerk einzudringen (Abb. 18 A und B). Während die frisch aus dem Knorpelgewebe freigesetzten Zellen eine typisch sphärische Form aufwiesen (Abb. 17 C), zeigten die adhärennten Chondrozyten auf der Oberfläche der BNC bereits einen aktivierten Phänotyp mit abgeflachtem Zellkörper, granulären Ausstülpungen und langen zytoplasmatischen Fortsätzen (Abb. 18 C).



**Abb. 18: REM-Aufnahmen eines chondrozytenbesiedelten BNC-Inserts nach 8-wöchiger Kultur und Entnahme aus der Knorpelscheibe. Vergrößerungen: 100x (A), 1000x (B), 5000x (C).**

Durch die dreidimensionale Sicht auf die Objekte konnte bestätigt werden, dass die mobilen Zellen ausschließlich aus der Superfizialschicht des Knorpels stammten und die BNC nur in unmittelbarer Defektnähe gürtelartig besiedelten. Eine dreidimensionale Besiedlung des Implantates mit Zellen konnte auch in der REM nicht beobachtet werden.

Die vergleichende strukturelle Untersuchung von Knorpel und BNC verdeutlichte die enorme morphologische Ähnlichkeit der beiden Materialien auf mikroskopischer Ebene (Abb. 19). BNC weist ebenso wie die Kollagenfibrillen des hyalinen Knorpels die typische Konfiguration eines dreidimensionalen Netzwerks aus einer Vielzahl von Einzelfasern auf. Insgesamt erschien die Cellulose im Vergleich zu den relativ großen Chondrozyten jedoch sehr engmaschig und damit eventuell nicht zugänglich für die Chondrozyten. Des Weiteren fiel eine dünne, sehr dichte Membran auf der BNC-Oberfläche auf, die das Material zu versiegeln schien und so eventuell ein tieferes Zelleindringen verhinderte (Abb. 18 B).



**Abb. 19: Netzwerk der Nanocellulose-Fasern (A) im Vergleich zu den Kollagen-Fasern des natürlichen Gelenkknorpels (B). Vergrößerung: 5000x.**

### 5.1.3 Einfluss der Kulturbedingungen auf Matrixstoffwechsel und -regeneration

Zur Klärung der Frage, inwieweit die Kulturbedingungen den Matrixstoffwechsel und die Knorpelhomöostase während der Langzeitversuche beeinflussten, wurde der Gehalt wichtiger Matrixkomponenten immunhistochemisch, biochemisch und z.T. molekularbiologisch analysiert. Die detaillierten Einzelergebnisse vorwegnehmend konnte dabei insgesamt kein deutlicher Einfluss einer zusätzlichen TGF- $\beta$ 1-Stimulation beobachtet werden.

#### 5.1.3.1 Proteoglykane

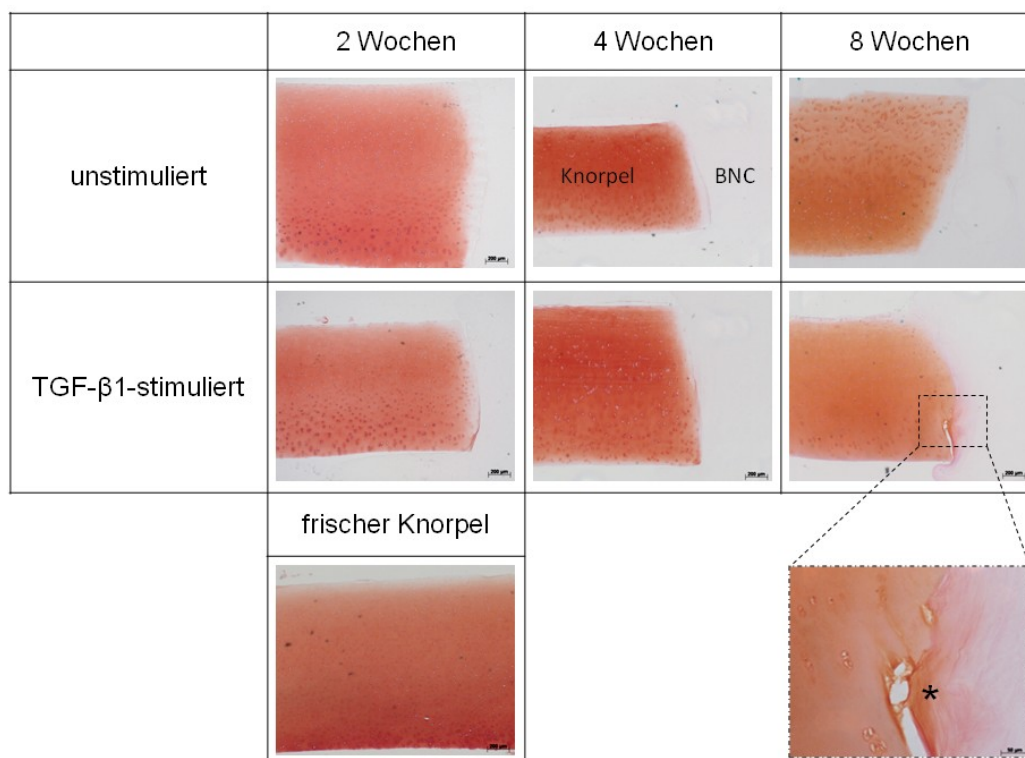
##### 5.1.3.1.1 Gesamt-Proteoglykane

##### Lichtmikroskopische PG-Darstellung

Die Safranin-O/Lichtgrün-Färbung diente der qualitativen Beurteilung des Netto-PG-Gehaltes sowie eines eventuellen Verlustes an PG aus der Matrix während der Langzeitkultur. Rot

gefärbte Areale sind dabei durch einen hohen Anteil an negativ geladenen Gruppen gekennzeichnet. Bei Verlust von PG und damit seiner sulfatierten Seitenketten wird das zuvor maskierte Kollagengerüst für die Gegenfärbung mit Lichtgrün zugänglich. PG-arme Regionen imponieren daher lichtmikroskopisch in einem grünen Farbton.

Sowohl der unstimulierte als auch der zusätzlich TGF- $\beta$ 1-stimulierte Knorpel zeigte über die gesamte Kulturdauer eine starke Safranin-O-Positivität als Hinweis auf einen hohen PG-Gehalt. Selbst nach 8-wöchiger Kultur ließ sich in den Proben qualitativ kein substantieller PG-Verlust im Vergleich zu frischem Knorpel nachweisen, was sich in nahezu identischen Färbeergebnissen aller Versuchsgruppen äußerte (Abb. 20). Interessanterweise war v.a. nach 8-wöchiger Kulturdauer eine beginnende PG-Einlagerung in den defektnahen Bereichen der BNC nachzuweisen.



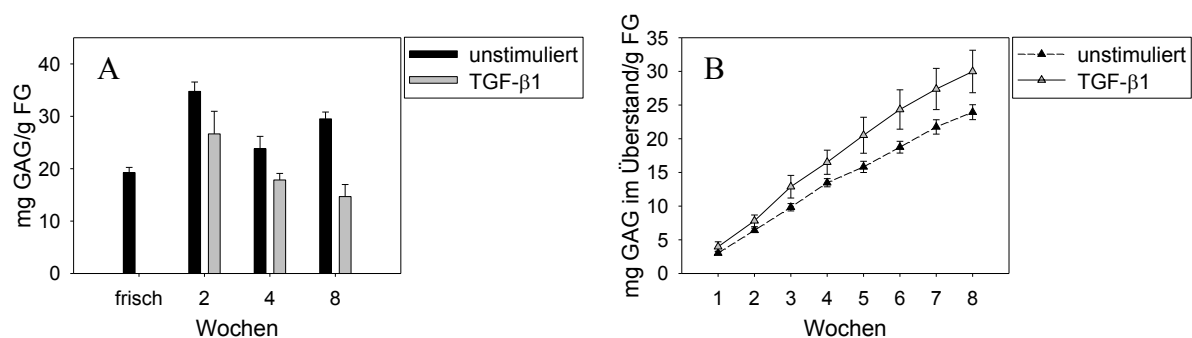
**Abb. 20: Lichtmikroskopische Darstellung des Netto-PG-Gehaltes im Knorpel.** Dargestellt sind repräsentative histologische Aufnahmen von unstimulierten bzw. TGF- $\beta$ 1-stimulierten Knorpel-BNC-Konstrukten nach 2, 4 bzw. 8 Wochen *In vitro*-Kultur im Vergleich zu frischem Knorpel. Safranin-O/Lichtgrün-Färbung. Originalvergrößerung 40x. \*Unten rechts: Defektnahe PG-Einlagerung in die BNC. Ausschnittsvergrößerung 200x.

#### Quantitative Netto-PG-Bestimmung

Mithilfe des DMB-Assays wurde die Konzentration von im Knorpel enthaltenen PG bestimmt, so dass quantitative Aussagen über den Netto-PG-Gehalt unter Langzeitkulturbedingungen möglich waren. Für den frischen Knorpel ergab sich eine GAG-

Konzentration von  $19,2 \pm 1,0$  mg GAG/g FG (Abb. 21 A). Der unstimulierte Knorpel zeigte demgegenüber über den gesamten Kulturzeitraum einen erhöhten Netto-PG-Gehalt, der nach 2 und 8 Wochen klar über dem Niveau des frischen Knorpels lag. V.a. in der frühen Phase der Regeneration (nach 2 Wochen) steigerte der unstimulierte Knorpel seinen Anteil an PG fast auf das Doppelte der Ausgangsreferenz ( $34,8 \pm 1,8$  mg/g FG). Nach einem zwischenzeitlichen Abfall der GAG-Konzentration auf  $23,8 \pm 2,4$  mg/g FG in der 4-Wochen-Messung war nach 8 Wochen ein erneuter Anstieg auf  $29,5 \pm 1,3$  mg/g FG zu beobachten.

Der TGF- $\beta$ 1-stimulierte Knorpel zeigte wesentlich geringere Unterschiede zum GAG-Level der frischen Probe. Zwar war auch hier ein initialer Anstieg des GAG-Gehaltes auf  $26,6 \pm 4,3$  mg/g FG nach 2 Wochen zu erkennen. In der Folgezeit fiel die PG-Konzentration unter TGF- $\beta$ 1-Stimulation jedoch wieder auf die Ausgangswerte des frischen Knorpels ab.



**Abb. 21: Quantitative Analyse des GAG-Gehaltes im Knorpel (A) bzw. der kumulativen GAG-Freisetzung in den Überstand (B) mittels DMB-Assay.** (A) Dargestellt ist der Vergleich zwischen frischem und kultiviertem Knorpel mit und ohne TGF- $\beta$ 1-Stimulation zu den verschiedenen Kulturzeitpunkten. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Duplikaten aus jeweils 4 gepoolten Proben  $\times$  5 Knorpelzylinder. (B) Dargestellt ist die kumulative GAG-Freisetzung aus dem unstimulierten bzw. TGF- $\beta$ 1-stimulierten Knorpel in das Kulturmedium über den gesamten Kulturzeitraum. Angegeben sind die kumulativen Mittelwerte  $\pm$  SEM von Quadruplikaten der wochenweise gepoolten Mediumüberstände.

#### PG-Freisetzung in den Mediumüberstand

Zur quantitativen Bestimmung kulturbedingter PG-Verluste aus dem Knorpel wurde die Menge an freigesetzten GAG im Mediumüberstand ebenfalls mithilfe des DMB-Assays analysiert. Die Überstände der einzelnen Versuchsansätze wurden hierzu bei jedem Mediumwechsel gesammelt und anschließend wochenweise gepoolt.

Sowohl der unstimulierte Knorpel als auch der Knorpel unter TGF- $\beta$ 1-Stimulation zeigten im Kulturverlauf eine kontinuierliche, nahezu lineare kumulative PG-Freisetzung in den Mediumüberstand, wobei der stimulierte Knorpel von Beginn an einen etwas höheren PG-Verlust zu verzeichnen hatte (Abb. 21 B). Insgesamt setzten die Proben der unstimulierten Gruppe im 8-wöchigen Kulturverlauf etwa  $23,9 \pm 1,1$  mg GAG/g FG in das Kulturmedium

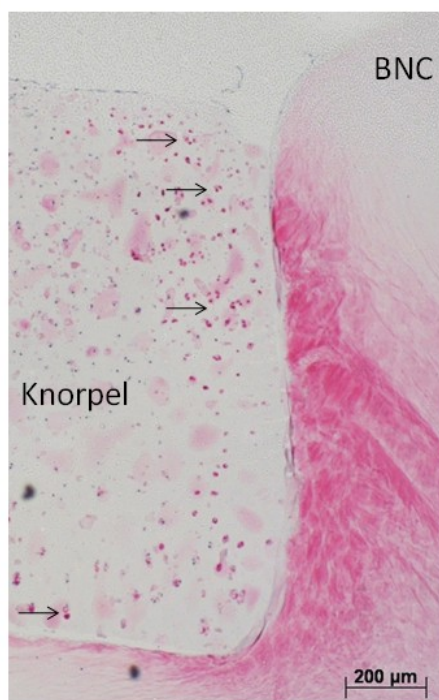


frei. Für die TGF- $\beta$ 1-behandelte Gruppe ergab sich ein Gesamtverlust von etwa  $30,0 \pm 3,2$  mg GAG/g FG nach 8 Wochen. Die wöchentlichen Einzel-Verluste an PG waren dabei in beiden Versuchsgruppen relativ konstant und lagen im Mittel bei  $2,9 \pm 0,1$  mg GAG/g FG für die unstimulierten und bei  $3,7 \pm 0,4$  mg GAG/g FG für die TGF- $\beta$ 1-behandelten Proben (detaillierte Daten zur wöchentlichen PG-Freisetzung auf Seite II im Anhang).

#### 5.1.3.1.2 Aggrekan

##### Immunhistochemische Darstellung des neugebildeten Aggrekans

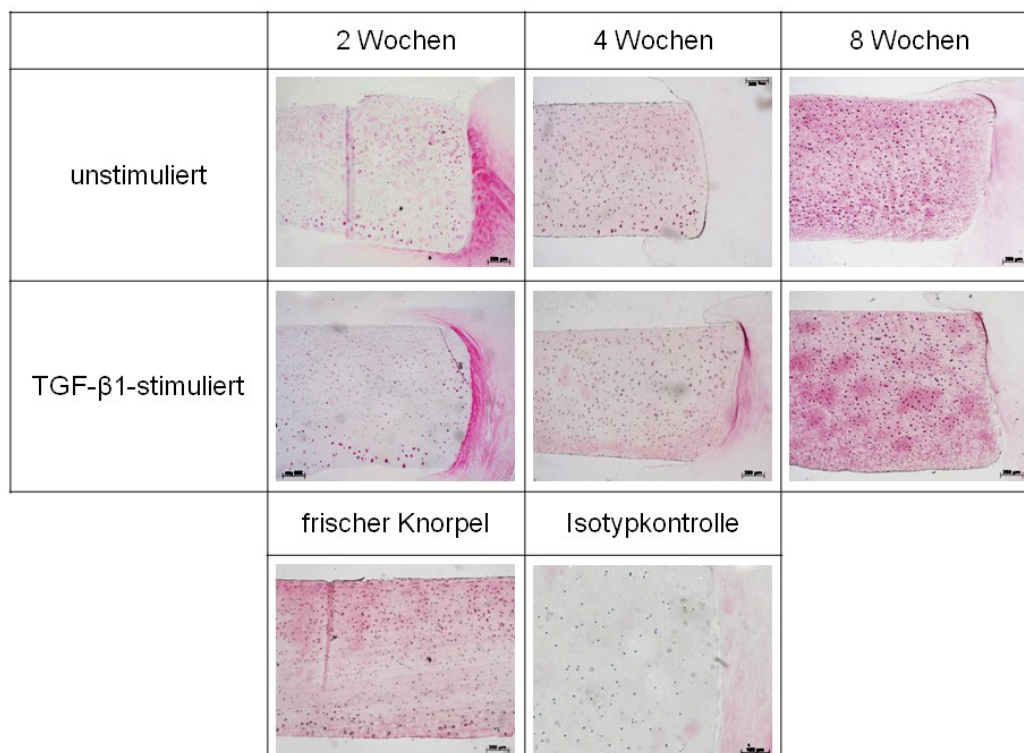
Die immunhistochemische Darstellung der Aggrekan-Neosynthese gelang unter Verwendung eines direkt gegen neugebildete Aggrekan-Moleküle gerichteten AK. Hierdurch konnte überprüft werden, inwieweit der Knorpel auf die initiale Defektsetzung mit anabolen bzw. regenerativen Prozessen reagiert. Neben dem qualitativen Nachweis einer Aggrekan-Neubildung wurde v.a. auch deren spezifische Lokalisation in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer ermöglicht. Die Vitalität der Chondrozyten wurde durch eine positive nachträgliche Kernfärbung mit Hämatoxylin nachgewiesen.



**Abb. 22:** „*Cartilage flow-Phänomen*“. Frühe Aggrekan-Neosynthese nach 2 Wochen ausschließlich in den perizellulären Bezirken defektnaher Chondrozyten (→). Einlagerung neugebildeten Aggrekans in BNC-Schichten nahe der Traumazone im Sinne einer primären Defektabdichtung. Originalvergrößerung 40x.

Unabhängig von der zusätzlichen TGF- $\beta$ 1-Stimulation zeigte sich bereits nach 2 Wochen ein anaboles Verhalten der Chondrozyten. In der frühen Phase der Regeneration waren v.a. Zellen in der Nähe der Traumazone syntheseaktiv, was sich durch eine lokal definierte, stark positive perizelluläre Anfärbung von Aggrekan-Neoepitopen nachweisen ließ. Interessanterweise beschränkte sich dieses Signal in den frühen Phasen der Regeneration ausschließlich auf die

defektnahen Chondrozyten an den Stanz- und Schnittträgern der Knorpelzylinder (Abb. 22). Zellen, die sich weiter entfernt vom Defekt im Inneren des Knorpels befanden sowie die interterritoriale Matrix waren hingegen nicht angefärbt und somit Aggrekan-negativ. Interessanterweise war auch innerhalb der Nanocellulose ein roter Farbgradient mit dem stärksten Signal an der Grenzfläche zum Knorpel und abnehmender Intensität in Richtung BNC-Zentrum nachweisbar. Dementsprechend lagerten die defektnahen Chondrozyten ihr neugebildetes Aggrekan im Sinne einer primären Defektabdichtung direkt in das angrenzende BNC-Gerüst ein („*Cartilage flow*“, Abb. 22). Der Anteil der Aggrekan-positiven Chondrozyten nahm im Laufe der Kulturdauer stetig zu. Nach 8 Wochen war die defektabhängige Lokalisation der Aggrekan-Neosynthese nicht mehr nachweisbar. Nahezu alle Zellen des Knorpelzylinders zeigten, unabhängig von ihrer Entfernung zum eigentlichen Defekt, eine positive perizelluläre Aggrekan-Färbung. Auch die interterritoriale Matrix zeigte zunächst nach 4, v.a. aber nach 8 Wochen einen deutlich höheren Anteil an neugebildetem Aggrekan, der in beiden Versuchsgruppen insgesamt die Farbintensität des frischen Knorpels noch übertraf und für eine Wiederherstellung des innergeweblichen Gleichgewichts zwischen anabolen und katabolen Prozessen sprach (Abb. 23).



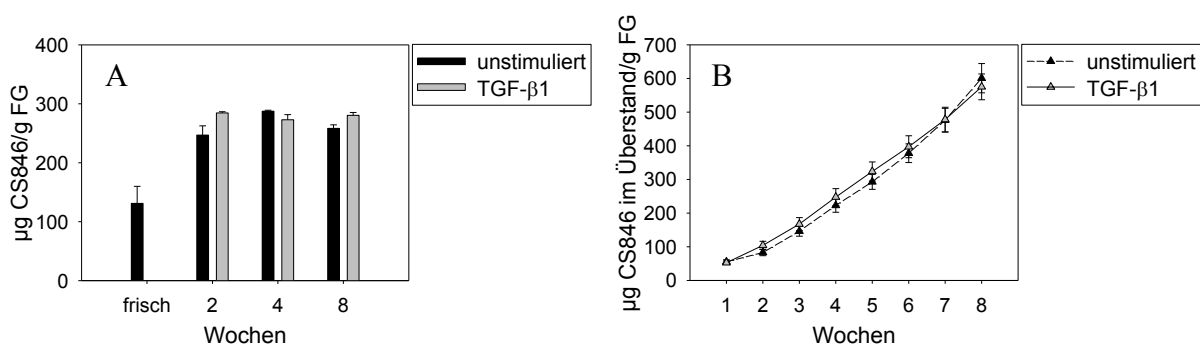
**Abb. 23: Immunhistochemische Darstellung von intaktem neugebildeten Aggrekan in Knorpel und BNC.** Dargestellt sind repräsentative histologische Aufnahmen von unstimulierten und TGF-β1-stimulierten Knorpel-BNC-Konstrukten nach 2, 4 bzw. 8 Wochen *In vitro*-Kultur im Vergleich zu frischem Knorpel. Originalvergrößerung 40x.



### Quantitativer Nachweis des Neoepitops CS846 im Knorpel und Mediumüberstand

Die regenerative Aktivität der Chondrozyten hinsichtlich der Neusynthese von Aggrecan wurde außerdem mittels quantitativer Analyse des Markers CS846 im Knorpel sowie seiner Freisetzung in den Mediumüberstand untersucht. CS846 ist ein Chondroitinsulfat-Neoepitop, das normalerweise nur im intakten fetalen Aggrecan vorkommt. Im Rahmen von Reparaturprozessen wird es jedoch auch im adulten Knorpel gebildet. Die Konzentration von CS846 korreliert mit der Aggrecan-Neosynthese im geschädigten Knorpel und wird in Tiermodellen und klinischen Studien als Biomarker eingesetzt, um die Synthese bzw. den Umsatz des Knorpels z.B. bei rheumatoider Arthritis, ankylosierender Spondylitis, OA und der Heilung von Knorpelschäden zu untersuchen.

In Extrakten aus frischem Knorpel ergab sich eine CS846-Konzentration von ca.  $131,0 \pm 28,9 \mu\text{g/g FG}$ . Der absolute CS846-Gehalt im kultivierten Knorpel war sowohl in den unstimulierten als auch in den Proben unter zusätzlicher TGF- $\beta$ 1-Stimulation über den gesamten Kulturzeitraum deutlich höher als im frischen, unkultivierten Knorpel (Abb. 24 A). Bereits nach 2 Wochen *In vitro*-Kultur hatte sich die Konzentration an CS846 als Zeichen einer exzessiven Aggrecan-Neosynthese in beiden Versuchsgruppen ungefähr verdoppelt. Dieses erhöhte Niveau wurde über den gesamten weiteren Kulturverlauf bei CS846-Konzentrationen um ca.  $260 \mu\text{g/g FG}$  nahezu konstant aufrecht erhalten.



**Abb. 24: Quantitative Analyse des CS846-Gehaltes im Knorpel (A) bzw. der kumulativen CS846-Freisetzung in den Mediumüberstand (B).** (A) Dargestellt ist der Vergleich zwischen frischem und kultiviertem Knorpel mit und ohne TGF- $\beta$ 1-Stimulation zu den verschiedenen Kulturzeitpunkten. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Duplikaten aus jeweils 4 gepoolten Proben  $\times$  5 Knorpelzylinder. (B) Dargestellt ist die kumulative CS846-Freisetzung aus dem unstimulierten bzw. TGF- $\beta$ 1-stimulierten Knorpel in das Kulturmedium über den gesamten Kulturzeitraum. Angegeben sind die kumulativen Mittelwerte  $\pm$  SEM von Quadruplikaten der wochenweise gepoolten Mediumüberstände.

Die kumulative Analyse der CS846-Freisetzung in den Mediumüberstand ergab für beide Versuchsgruppen einen fast kongruenten Kurvenverlauf. Dabei war über den Kulturzeitraum von 8 Wochen eine exponentielle Zunahme des ins Medium sezernierten CS846

nachzuweisen, so dass nach Versuchsabschluss ein CS846-Verlust von insgesamt etwa 600 µg/g FG detektiert wurde (Abb. 24 B). Die wöchentlichen Einzelwerte an freigesetztem CS846 zeigten im Mittel in beiden Versuchsgruppen einen insgesamt zunehmenden Trend und gipfelten bei einem CS846-Verlust von etwa  $124,9 \pm 8,1$  µg/g FG (unstimuliert) bzw.  $97,1 \pm 1,8$  µg/g FG (TGF-β1) zwischen Woche 7 und 8 (Daten auf Seite II im Anhang gezeigt). Damit erreichte die Menge des ins Medium sezernierten CS846 im Laufe der Kultur eine ähnliche Dimension wie das im Knorpel enthaltene CS846.

### Aggrekan-mRNA-Expression

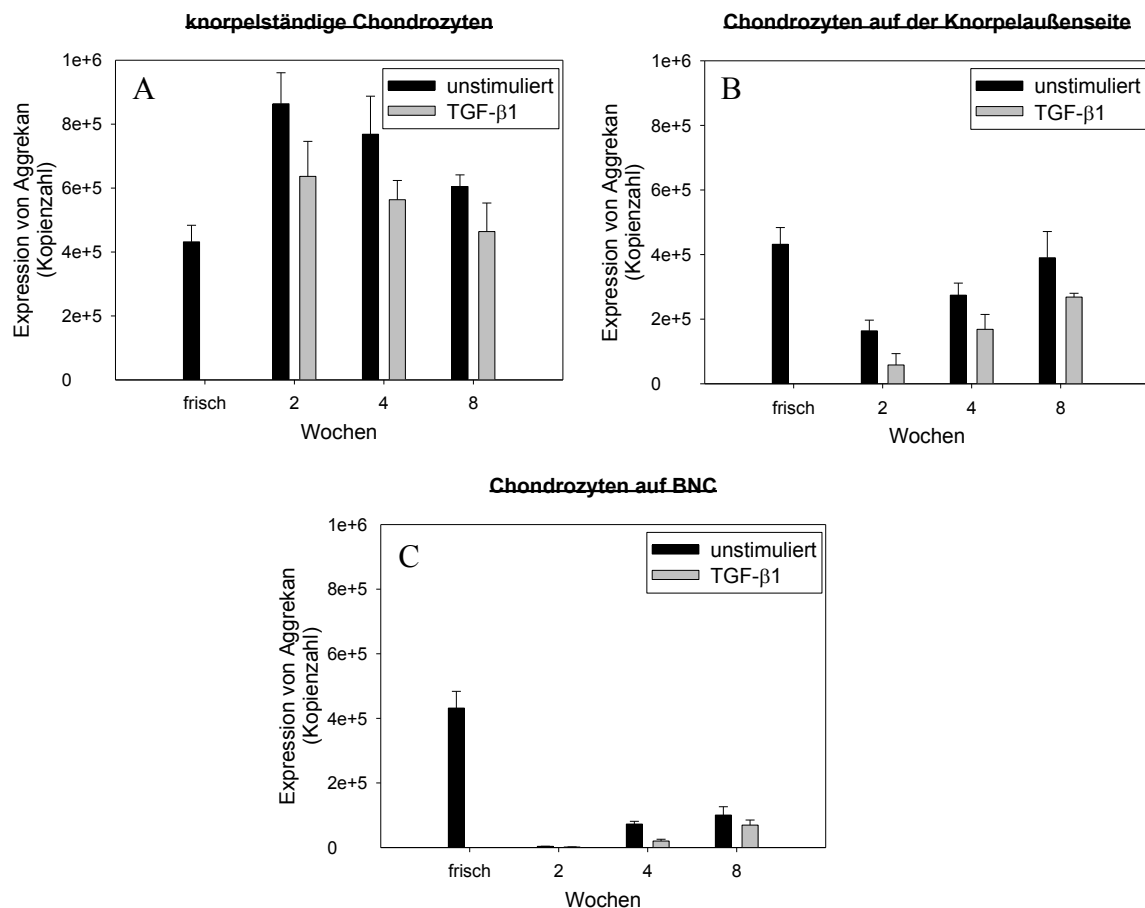
Mittels molekularbiologischer Untersuchungen war es möglich, in der Aggrekan-Analyse auch differenzierte Aussagen über die Syntheseaktivität einzelner Zellpopulationen zu treffen. Durch Anwendung der „real time“-RT-PCR gelang es, die mRNA-Expression von Aggrekan separat für knorpelständige Chondrozyten sowie für migrierte Chondrozyten auf der Knorpelaußenseite bzw. auf der BNC zu analysieren.

In den kultivierten knorpelständigen Chondrozyten erhöhte sich die Aggrekan-Expression gegenüber dem Wert von frischem, nicht kultiviertem Knorpel deutlich. Dieser Effekt war in den unstimulierten Proben stärker ausgeprägt als in den mit TGF-β1-stimulierten Proben und zeigte auch eine deutliche Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. So kam es hier zu einer initialen Zunahme der Aggrekan-mRNA-Synthese mit einem Maximum beim doppelten Ausgangswert nach 2 Wochen, die dann im Kulturverlauf auf das etwa 1,5-fache im Vergleich zum Frischknorpel abfiel. Die TGF-β1-stimulierten Chondrozyten hingegen erreichten initial lediglich ein Maximum ihrer Aggrekan-mRNA-Expression vom ca. 1,5-fachen des frischen Knorpels und fielen dann schnell wieder auf dessen Niveau zurück (Abb. 25 A).

Die Aggrekan-Expression der auf die Knorpeloberfläche migrierten Chondrozyten war im Gegensatz zu den knorpelständigen Chondrozyten wesentlich schwächer ausgeprägt und erreichte nach 2 Wochen nur ca. 40% des Ausgangswertes im frischen Knorpel. Interessanterweise zeigte sich hier jedoch in beiden Versuchsgruppen abhängig von der Kulturdauer ein positiver Trend, so dass die mRNA-Expression in den unstimulierten Chondrozyten nach 8 Wochen bereits wieder auf das Ausgangsniveau des Frischknorpels anstieg (Abb. 25 B).

Für die auf der BNC-Oberfläche adhärennten Chondrozyten ergab sich ein ähnliches Bild. Nach 2 Wochen war die Syntheseaktivität der ausgewanderten Zellen auf ein Minimum reduziert (Abb. 25 C). Nach einer gewissen Erholungszeit nahmen die adhärennten

Chondrozyten ihre Transkriptionstätigkeit wieder auf und steigerten im Kulturverlauf die Menge von Aggrecan-mRNA kontinuierlich auf bis zu ein Viertel der Frischknorpelreferenz. Ähnlich wie bei den knorpelständigen Chondrozyten war auch bei den auf die Knorpelaußenseite migrierten bzw. adhärennten Zellen auf der BNC zwar ein gleichförmiger Kurvenverlauf, insgesamt jedoch ein reprimierender Einfluss der TGF- $\beta$ 1-Stimulation auf die Aggrecansynthese erkennbar.



**Abb. 25:** Aggrecan-mRNA-Expression in knorpelständigen (A) sowie in mobilisierten Chondrozyten auf der Knorpelaußenseite (B) bzw. auf der BNC (C). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Expression von Duplikaten aus jeweils 4 gepoolten Proben  $\times$  5 Knorpelzylinder.

### 5.1.3.2 COMP

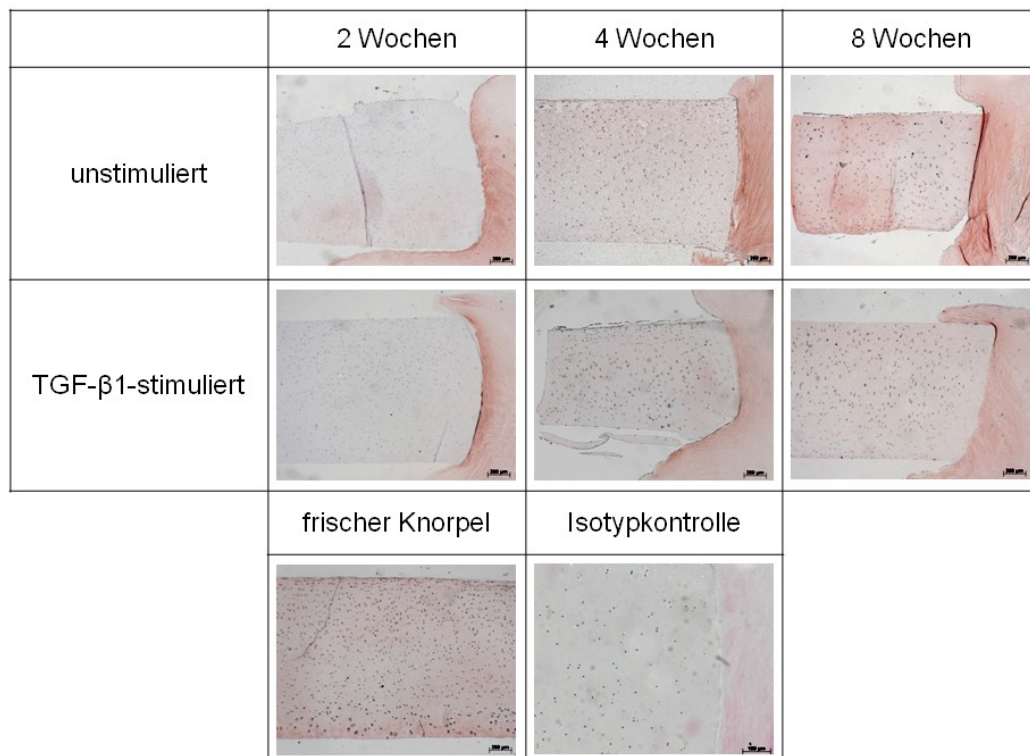
#### Immunhistochemische Darstellung des Netto-COMP-Gehaltes

Der Einfluss der Langzeitkulturbedingungen auf den Netto-Gehalt an COMP als Bestandteil der EZM wurde mittels immunhistochemischer Färbungen analysiert.

Insgesamt konnte in allen Schnitten eine nur wenig intensive Anfärbung von COMP erreicht werden, so dass auch die beobachteten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nicht als gravierend einzustufen sind. Im Vergleich zum frischen und

unkultivierten Knorpel, der eine zart rote, oberflächenbetonte Immunfärbung aufwies, war die Farbintensität in den Schnitten nach 2 Wochen *In vitro*-Kultur in beiden Versuchsgruppen sichtbar vermindert, ein Zeichen für einen erniedrigten COMP-Gehalt. Bei zunehmender Kulturdauer kam es jedoch wieder zu einer stärkeren Färbung von COMP v.a. in den perizellulären Bezirken aller Knorpelschichten. Spezifische lokale Unterschiede in der Anfärbbarkeit, wie sie für Aggrekan nachgewiesen wurden (5.1.3.1.2), waren nicht ersichtlich.

Die mikroskopische Beurteilung ergab v.a. nach 8 Wochen einen gegenüber den TGF- $\beta$ 1-behandelten Proben leicht erhöhten COMP-Gehalt im unstimulierten Knorpel. Interessanterweise zeigte sich auch für COMP eine stark positive Anfärbung der BNC mit einem Intensitätsgradienten von der Knorpelgrenze in Richtung Cellulose-Zentrum, so dass auch hier eine Einlagerung in das BNC-Gerüst anzunehmen ist (Abb. 26).



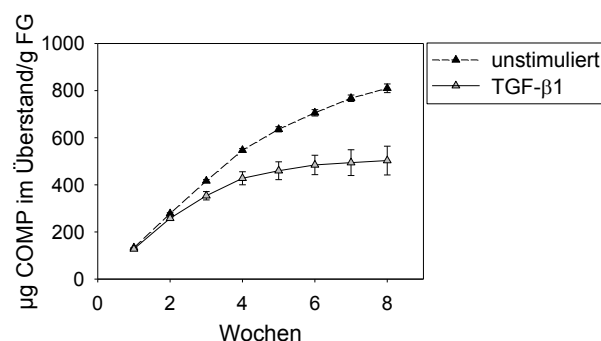
**Abb. 26: Immunhistochemische Darstellung von COMP in Knorpel und BNC.** Dargestellt sind repräsentative histologische Aufnahmen von unstimulierten Knorpel-BNC-Konstrukten nach 2, 4 bzw. 8 Wochen *In vitro*-Kultur im Vergleich zu frischem Knorpel. Originalvergrößerung 40x.

#### Quantitativer Nachweis von COMP im Knorpel und Mediumüberstand

Aufgrund proteindenaturierender Methoden zur Proteinextraktion gelang der biochemische Nachweis von COMP weder im kultivierten Knorpel noch im frischen Knorpelextrakt, so dass

leider keine quantitativen Aussagen über den Netto-Gehalt des Knorpels an COMP während der Kultur gemacht werden können.

Die Konzentration des aus dem Knorpel in den Überstand freigesetzten COMP konnte jedoch mittels ELISA detektiert und somit quantifiziert werden (Abb. 27). Die Analyse ergab für beide Versuchsgruppen eine initial hohe Freisetzung von COMP aus der Matrix von jeweils weit über 100 µg/g FG/Woche in den ersten drei bis vier Kulturwochen, so dass beide Kumulativkurven zunächst einen nahezu linearen Verlauf nahmen. In der zweiten Kulturhälfte war die wöchentliche COMP-Freisetzung in beiden Versuchsgruppen kontinuierlich regredient (Einzeldaten auf Seite II im Anhang gezeigt) und die Kumulativkurven flachten deutlich ab. Insgesamt konnte aus dem unstimulierten Knorpel von Beginn an eine etwas höhere COMP-Freisetzung ins Kulturmedium beobachtet werden. Nach 8 Wochen Versuchsdauer wurden hier ca.  $810,0 \pm 18,4$  µg COMP/g FG in die Mediumüberstände sezerniert, wohingegen der TGF-β1-stimulierte Knorpel über 8 Wochen Langzeitkultur nur ca.  $503,0 \pm 61,2$  µg COMP/g FG in das Kulturmedium freisetzte.



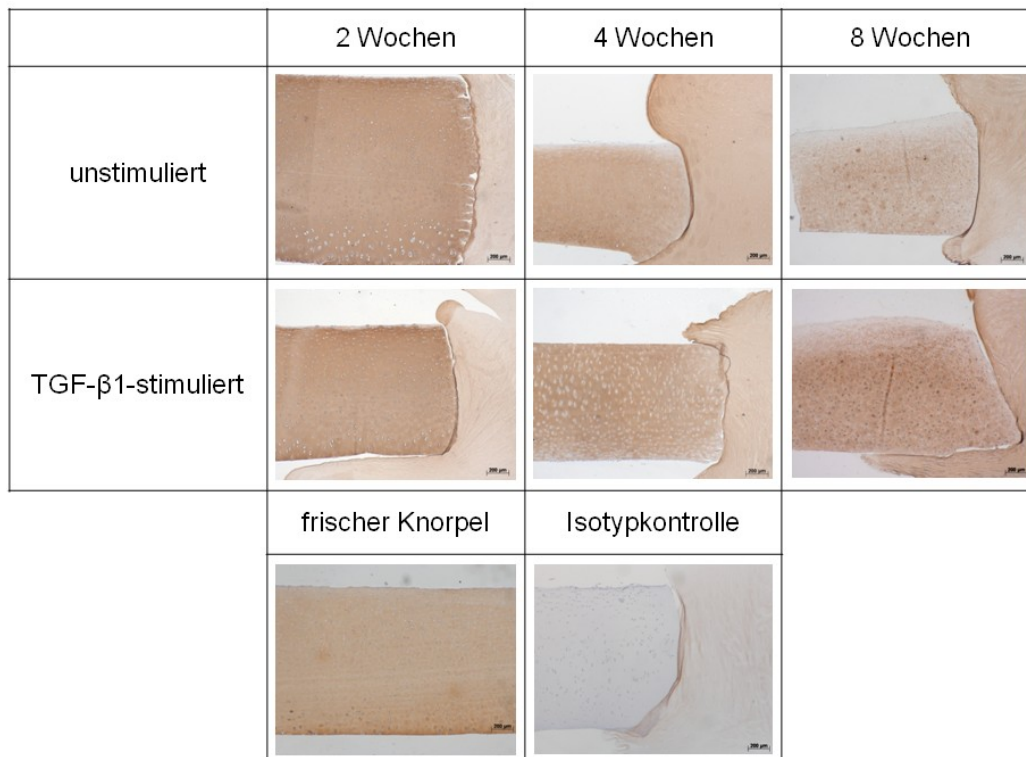
**Abb. 27: Quantitative Analyse der kumulativen COMP-Freisetzung in den Mediumüberstand.** Dargestellt ist die kumulative COMP-Freisetzung aus dem unstimulierten bzw. TGF-β1-stimulierten Knorpel in das Kulturmedium über den gesamten Kulturzeitraum. Angegeben sind die kumulativen Mittelwerte  $\pm$  SEM von Quadruplikaten der wochenweise gepoolten Mediumüberstände.

### 5.1.3.3 Kollagen Typ II

#### Immunhistochemische Darstellung des Netto-Gehaltes von Kol2

Das für die mechanische Stabilität und Zugfestigkeit des Knorpels wichtige Kol2 wurde immunhistochemisch in beiden Versuchsgruppen in nahezu identischer Menge nachgewiesen. Die mikroskopische Evaluation ergab, dass über den gesamten Kulturzeitraum der Netto-Gehalt des Knorpels an Kol2 zufriedenstellend aufrechterhalten wurde. Lokale Unterschiede des Färbeergebnisses zeigten sich im Verlauf v.a. im unstimulierten Knorpel lediglich an den Schnitt- und Stanzrändern der Knorpeloberfläche, wo nach 4 und v.a. nach 8 Wochen *In vitro*-Kultur der Kol2-Gehalt im Vergleich zum frischen Knorpel zum Teil deutlich sank (Abb. 28),

während sich der Kol2-Gehalt in den tieferen Knorpelbezirken weiterhin unverändert stark präsentierte. Interessanterweise war Kol2 in beiden Versuchsgruppen bereits ab 2-wöchiger Kulturdauer auch ubiquitär im BNC-Gerüst nachzuweisen. Somit zeigte sich auch für diesen Knorpelmarker eine beginnende Ablagerung in der initial proteinfreien BNC-Matrix.



**Abb. 28: Immunhistochemische Darstellung von Kol2 in Knorpel und BNC.** Dargestellt sind repräsentative histologische Aufnahmen von unstimulierten und TGF-β1-stimulierten Knorpel-BNC-Konstrukten nach 2, 4 bzw. 8 Wochen *In vitro*-Kultur im Vergleich zu frischem Knorpel. Originalvergrößerung 40x.

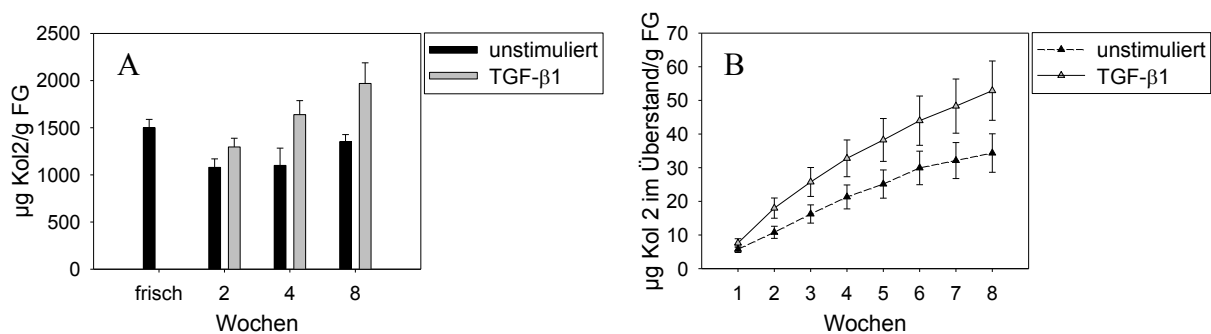
#### Quantitativer Nachweis von Kol2 im Knorpel und Mediumüberstand

Die Netto-Konzentration von im Knorpel enthaltenem Kol2 wurde mittels spezifischem ELISA bestimmt. Für frischen, unstimulierten Knorpel ergab sich hierbei eine Kol2-Konzentration von ca.  $1500,6 \pm 88,3 \mu\text{g/g FG}$  (Abb. 29).

Der Kol2-Gehalt im unstimulierten kultivierten Knorpel lag über den gesamten Kulturzeitraum in niedrigeren Konzentrationsbereichen. Initial zeigte sich nach 2 Wochen *In vitro*-Kultur ein Abfall auf ca.  $1079,7 \pm 90,0 \mu\text{g/g FG}$ . Anschließend schien sich jedoch eine gewisse Erholung einzustellen und der Kol2-Gehalt stieg erneut auf  $1100,8 \pm 183,4 \mu\text{g/g FG}$  nach 4 Wochen bzw. auf  $1352,3 \pm 75,1 \mu\text{g/g FG}$  nach 8 Wochen an, erreichte jedoch noch nicht das Niveau des Frischknorpels. Unter TGF-β1-Stimulation war der initiale Kol2-Abfall etwas weniger ausgeprägt (ca.  $1296,2 \pm 92,6 \mu\text{g/g FG}$ ). In diesen Proben war bereits nach 4

Wochen das Ausgangslevel des frischen Knorpels überschritten. Die Messung nach 8 Wochen *In vitro*-Kultur ergab schließlich eine Erhöhung des Kol2-Gehaltes in den TGF- $\beta$ 1-behandelten Proben auf ca.  $1969,4 \pm 218,8 \mu\text{g/g FG}$ .

Die Mengen des in das Kulturmedium freigesetzten Kol2 waren im Vergleich zum Netto-Kol2-Gehalt des Knorpels verschwindend gering. Im Kulturverlauf wurde in beiden Versuchsgruppen eine kontinuierliche wöchentliche Sekretion kleinster Mengen Kol2 von im Mittel  $4,3 \mu\text{g/g FG}$  in den unstimulierten bzw.  $6,6 \mu\text{g/g FG}$  in den TGF- $\beta$ 1-stimulierten Proben beobachtet, wobei die wöchentlich freigesetzten Kol2-Mengen im Verlauf eher abnahmen (Einzelergebnisse auf Seite II im Anhang gezeigt). Insgesamt wurde von Beginn an eine etwas höhere Kol2-Freisetzung aus dem TGF- $\beta$ 1-stimulierten Knorpel ins Kulturmedium beobachtet. Nach 8 Wochen Versuchsdauer wurden hier ca.  $52,9 \pm 14,5 \mu\text{g/g FG}$  in die Mediumüberstände sezerniert, wohingegen der unstimulierte Knorpel über 8 Wochen Langzeitkultur nur ca.  $34,4 \pm 5,7 \mu\text{g/g FG}$  in das Kulturmedium freisetzte.



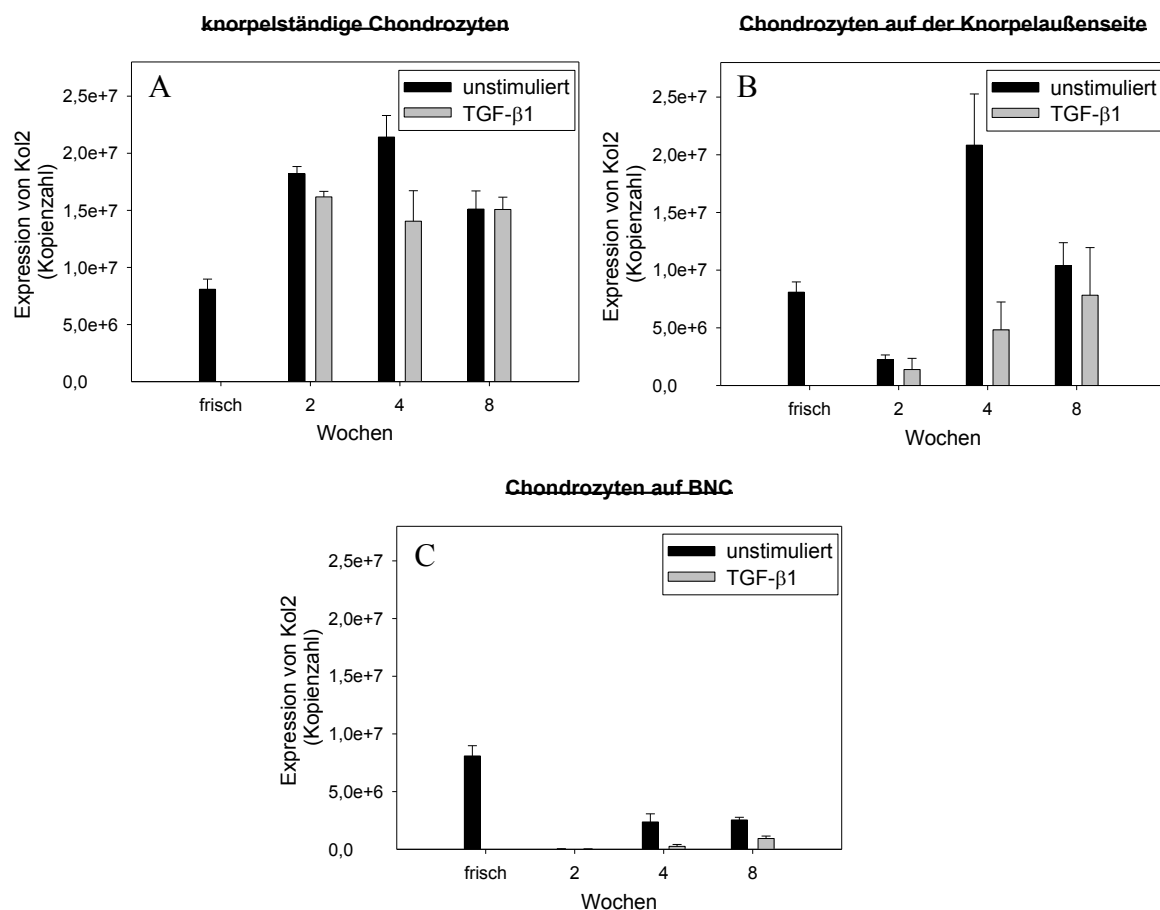
**Abb. 29: Quantitative Analyse des Kol2-Nettogehaltes im Knorpel (A) bzw. der kumulativen Freisetzung von Kol2 in den Mediumüberstand (B).** Dargestellt ist der Vergleich zwischen frischem und kultiviertem Knorpel mit und ohne TGF- $\beta$ 1-Stimulation zu den verschiedenen Kulturzeitpunkten. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Duplikaten aus jeweils 4 gepoolten Proben  $\times$  5 Knorpelzylinder. (B) Dargestellt ist die kumulative Kol2-Freisetzung aus dem unstimulierten bzw. TGF- $\beta$ 1-stimulierten Knorpel in das Kulturmedium über den gesamten Kulturzeitraum. Angegeben sind die kumulativen Mittelwerte  $\pm$  SEM von Quadruplikaten der wochenweise gepoolten Mediumüberstände.

### Kol2-mRNA-Expression

Mittels Real time-PCR gelang es wiederum, differenzierte Aussagen über die Transkriptionsaktivität der knorpelständigen, auf die Knorpelaußenseite migrierten und auf der BNC adhärenen Chondrozyten zu treffen.

Die Kol2-mRNA-Expression war in allen kultivierten Proben von knorpelständigen Chondrozyten im Vergleich zum frischen Knorpel deutlich erhöht (Abb. 30 A). Das Maximum der Syntheseaktivität erreichten dabei die Chondrozyten des unstimulierten

Knorpels nach 4 Wochen, deren Kol2-mRNA-Expression auf das ca. 2,7-fache der Frischknorpelreferenz erhöht war. Die TGF- $\beta$ 1-stimulierten Zellen hingegen zeigten eine initial weniger deutliche Zunahme der Kol2-Expression auf etwa das 2,0-fache des frischen Knorpels und hielten dieses Transkriptionsniveau über den gesamten Kulturverlauf aufrecht. Die Kol2-Expression der auf die Knorpeloberfläche migrierten Chondrozyten war im Gegensatz zu den knorpelständigen Chondrozyten initial wesentlich schwächer ausgeprägt und betrug nach 2 Wochen nur ca. 27% des Ausgangswertes im frischen Knorpel. Interessanterweise zeigte sich hier jedoch im Kulturverlauf eine kontinuierliche Erholung (unter TGF- $\beta$ 1) bzw. eine überschießende Kompensation (unstimuliert), so dass die mRNA-Expression nach 8 Wochen in beiden Versuchsgruppen bereits wieder das Ausgangsniveau des frischen Knorpels erreichte (Abb. 30 B).



**Abb. 30:** Kol2-mRNA-Expression in knorpelständigen (A) sowie in mobilisierten Chondrozyten auf der Knorpelaußenseite (B) bzw. auf der BNC (C). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Expression von Duplikaten aus jeweils 4 gepoolten Proben á 5 Knorpelzylinder.

Bei den adhärennten Chondrozyten auf der BNC zeigten sich ähnliche Resultate wie im Falle des Aggrekans. Initial war die Syntheseaktivität der ausgewanderten Zellen wiederum auf ein



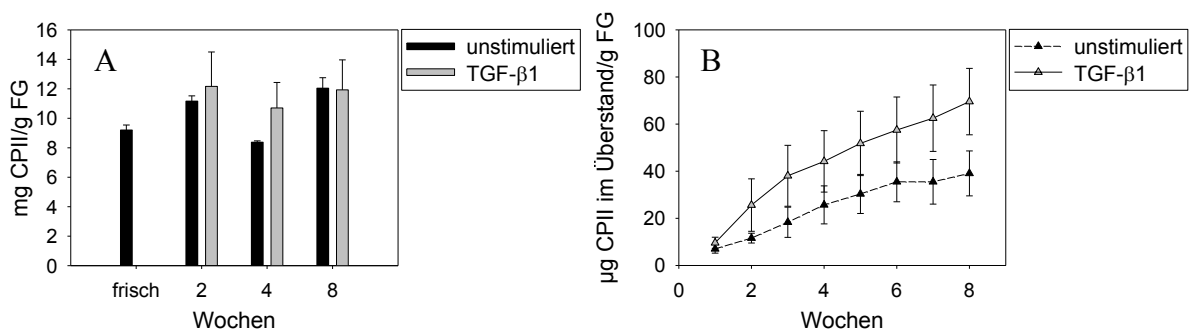
Minimum reduziert (Abb. 30 C). Nach 4 Wochen allerdings schienen sich die adhärennten Chondrozyten genügend erholt zu haben, um ihre Transkriptionstätigkeit wieder aufzunehmen und die Mengen an Kol2-mRNA im weiteren Kulturverlauf kontinuierlich auf fast ein Drittel der Mengen im frischen Knorpel zu steigern (unstimuliert).

Insgesamt wurde auch im Falle von Kol2 der eher reprimierende Einfluss einer zusätzlichen TGF- $\beta$ 1-Stimulation auf die mRNA-Synthese sichtbar.

### Kol2-Neosynthese

Die differenzierte Analyse der anabolen Gewebsprozesse bezüglich echter Kol2-Neosynthese während der Langzeitkultur geschah mittels des Aufbaumarkers CII-Propeptid. Dieses Molekül wird während der Freisetzung von neu synthetisiertem Kol2 in die Matrix vom C-terminalen Ende des Prokollagens abgespalten. Sein Gehalt korreliert direkt mit der Neosynthese von Kol2.

Für frischen, unstimulierten Knorpel ergab sich hierbei eine CII-Konzentration von  $9,2 \pm 0,3$  mg/g FG. Dieses Konzentrationsniveau des Prokollagen-Neoepitops wurde unabhängig vom TGF- $\beta$ 1-Stimulus über den gesamten Kulturzeitraum in allen Versuchsgruppen mindestens aufrecht erhalten. In der Gruppe des unstimulierten Knorpels zeigte sich nach 2 bzw. 8 Wochen sogar eine geringe gesteigerte Neosynthese von Prokollagenen auf  $12,0 \pm 0,7$  mg/g FG (Abb. 31 A).



**Abb. 31: Quantitative Analyse des CII-Nettogehaltes im Knorpel (A) bzw. der kumulativen Freisetzung von CII in den Mediumüberstand (B).** Dargestellt ist der Vergleich zwischen frischem und kultiviertem Knorpel mit und ohne TGF- $\beta$ 1-Stimulation zu den verschiedenen Kulturzeitpunkten. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Duplikaten aus jeweils 4 Proben  $\times$  5 Knorpelzylinder. (B) Dargestellt ist die kumulative CII-Freisetzung aus dem unstimulierten bzw. TGF- $\beta$ 1-stimulierten Knorpel in das Kulturmedium über den gesamten Kulturzeitraum. Angegeben sind die kumulativen Mittelwerte  $\pm$  SEM von Quadruplikaten der wochenweise gepoolten Mediumüberstände.

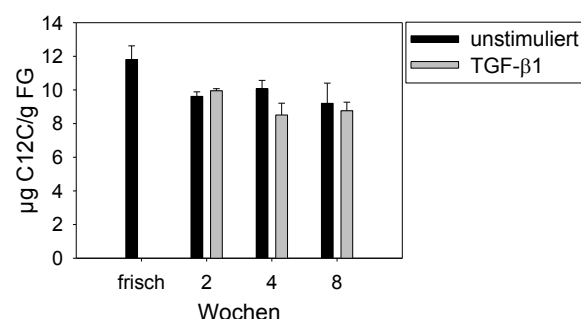
Die Freisetzung von Prokollagenen in den Mediumüberstand erfolgte im Vergleich zum Knorpelgehalt an CPII in vernachlässigbaren Dimensionen (Faktor 1:1000). Die kontinuierlich beobachtete wöchentliche Sekretion kleinster Mengen CPII zeigte im Verlauf einen eher rückläufigen Trend (Einzelergebnisse auf Seite II im Anhang gezeigt). Wiederum konnte aus dem TGF- $\beta$ 1-stimulierten Knorpel von Beginn an eine etwas höhere CPII-Freisetzung ins Kulturmedium beobachtet werden. Nach 8 Wochen Versuchsdauer wurden hier ca.  $63,3 \pm 7,8 \mu\text{g/g}$  FG in die Mediumüberstände sezerniert, wohingegen der unstimulierte Knorpel über 8 Wochen Langzeitkultur nur ca.  $39,1 \pm 7,1 \mu\text{g/g}$  FG in das Medium freisetzte (Abb. 31 B).

### Kol2-Abbau

Zur Detektion eines eventuellen Kollagenabbaus unter den Kulturbedingungen im Langzeitmodell wurde der Gehalt an C12C-Peptid in den Knorpelextrakten und den Kulturüberständen bestimmt. Dieses Neopepitop entsteht vorwiegend bei der Spaltung von Kol2 durch Kollagenasen und agiert als Abbaumarker bei extensiver Destruktion.

Für frischen, unstimulierten Knorpel ergab sich eine C12C-Konzentration von  $11,8 \pm 0,8 \mu\text{g/g}$  FG. Die Analyse der Knorpelextrakte ergab für alle Versuchsgruppen unabhängig von der Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 eine gegenüber dem frischen Knorpel klare Reduktion des C12C-Gehaltes um etwa 20% (Abb. 32). Dieses reduzierte C12C-Niveau blieb über den gesamten Kulturzeitraum relativ konstant erhalten.

Der Gehalt des C12C-Neopepitops in den Kulturüberständen lag in allen Proben deutlich unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA-Kits und war demnach nur in Spuren in Mediumüberstand enthalten.



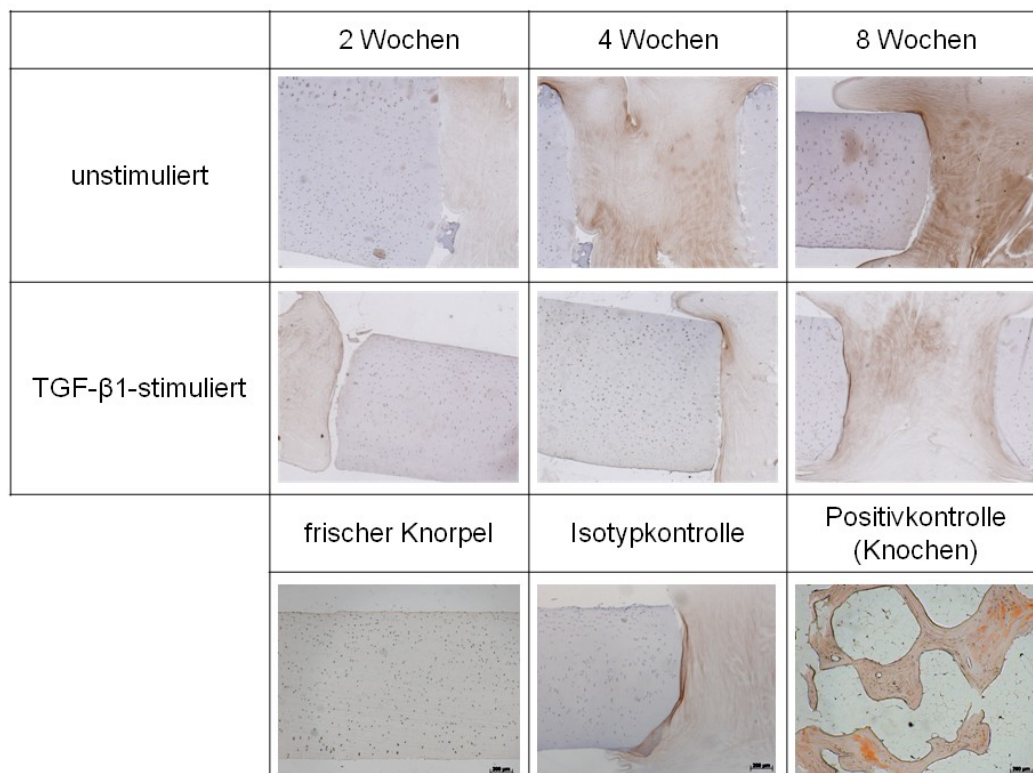
**Abb. 32: Quantitative Analyse des C12C-Gehaltes im Knorpel.** Dargestellt ist der Vergleich zwischen frischem und kultiviertem Knorpel mit und ohne TGF- $\beta$ 1-Stimulation zu den verschiedenen Kulturzeitpunkten. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Duplikaten aus jeweils 4 Proben  $\times$  5 Knorpelzylinder.

### 5.1.3.4 Kollagen Typ 1

Der Gehalt an Kol1 während der Langzeitkultur wurde sowohl immunhistochemisch als auch molekularbiologisch untersucht und als Marker für das Ausmaß der Chondrozyten-dedifferenzierung unter den Modellbedingungen herangezogen.

#### Immunhistochemische Darstellung des Netto-Kol1-Gehaltes

In der immunhistochemischen Darstellung der Knorpel-BNC-Konstrukte wurde Kol1 im frischen Knorpel erwartungsgemäß nicht detektiert. Der Netto-Gehalt des Knorpels stieg jedoch auch unter den Bedingungen der Langzeitkultur nicht an, so dass Kol1 selbst nach 8 Wochen weder in den unstimulierten noch in den TGF- $\beta$ 1-behandelten Proben qualitativ nachgewiesen wurde (Abb. 33). In der BNC hingegen konnte im Kulturverlauf v.a. in den unstimulierten Proben eine zunehmende Anreicherung von Kol1 beobachtet werden, die sich jedoch gegenüber der immunhistochemisch nachgewiesenen Akkumulation von Kol2 im Cellulose-Netzwerk (siehe Abb. 28) als qualitativ schwächer präsentierte.



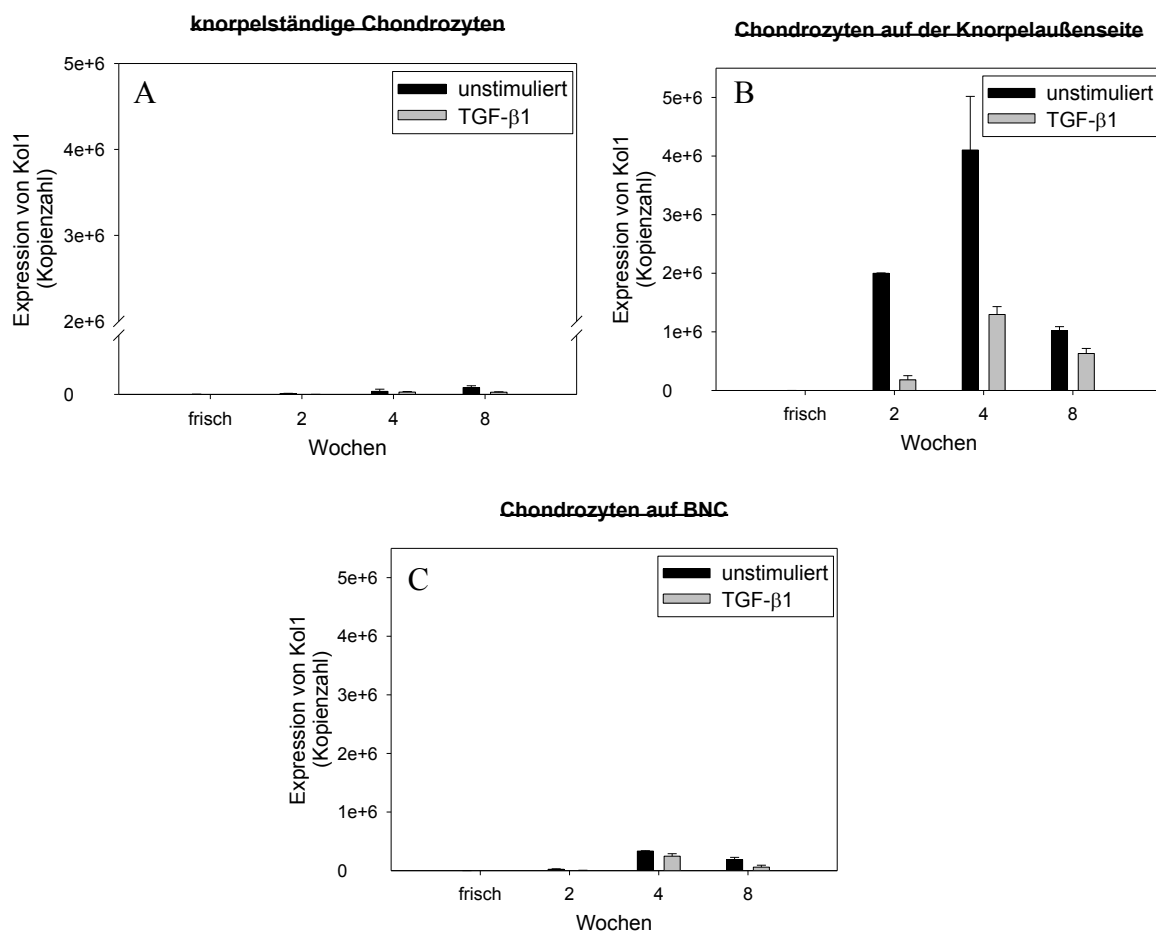
**Abb. 33: Immunhistochemische Darstellung von Kol1 in Knorpel und BNC.** Dargestellt sind repräsentative histologische Aufnahmen von unstimulierten und TGF- $\beta$ 1-stimulierten Knorpel-BNC-Konstrukten nach 2, 4 bzw. 8 Wochen *In vitro*-Kultur im Vergleich zu frischem Knorpel. Originalvergrößerung 40x.

### Quantitativer Nachweis von Kol1 im Knorpel und Mediumüberstand

Die quantitative biochemische Analyse des Kol1-Gehaltes mittels ELISA, wie sie für Kol2 durchgeführt wurde, konnte leider nicht durchgeführt werden, da zum Zeitpunkt der Analysen kein kommerzielles Nachweissystem für bovines Kol1 existierte.

### Kol1-mRNA-Expression

Erwartungsgemäß exprimierte frischer Knorpel nahezu kein Kol1 (Abb. 34 A). Die knorpelständigen Chondrozyten innerhalb der Zylindermatrix behielten diesen Phänotyp über den gesamten Kulturzeitraum bei und exprimierten Kol1 auf einem im Vergleich zu den mobilisierten Zellen vernachlässigbaren Level.



**Abb. 34: Kol1-mRNA-Expression in knorpelständigen (A) sowie in mobilisierten Chondrozyten auf der Knorpelaußenseite (B) bzw. auf der BNC (C).** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der mRNA-Expression von Duplikaten aus jeweils 4 Proben  $\times$  5 Knorpelzylinder.

Trotz des geringen Anfangsniveaus steigerten v.a. die Chondrozyten im unstimulierten Knorpel ihre Kol1-Expression zunehmend auf etwa das 15-fache des Niveaus im frischen Knorpel nach 4 und etwa das 30-fache nach 8 Wochen. Sie exprimierten damit v.a. in den

letzten 4 Kulturwochen deutlich mehr Koll1 als die Zellen der TGF- $\beta$ 1-stimulierten Proben, deren maximale Koll1-Expression etwa beim 10-fachen des Ausgangswertes lag.

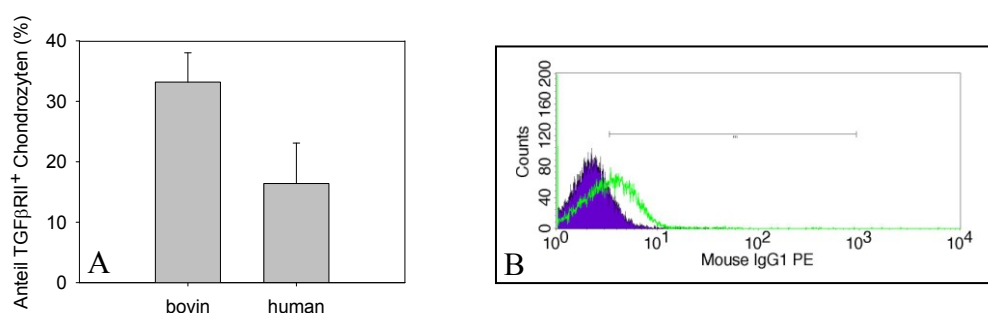
Interessanterweise exprimierten dagegen die aus der Knorpelmatrix mobilisierten Chondrozyten sehr hohe Mengen von mRNA für Koll1. Wiederum war dabei die Koll1-Expression der unstimulierten Zellen zu allen Zeiten höher als unter TGF- $\beta$ 1-Stimulation. Sie erreichte ihr Maximum nach 4 Wochen beim mehr als 12 000-fachen des Wertes im frischen Knorpel und fiel dann wieder auf ein niedrigeres Niveau ab (Abb. 34 B). Im Gegensatz zu den mobilisierten Zellen wurde von den Chondrozyten, die bereits auf der BNC-Oberfläche adhären, sehr viel weniger mRNA für Koll1 exprimiert. Die Koll1-mRNA-Expression in den unstimulierten Zellen erwies sich wiederum zu allen Zeiten etwas höher als unter TGF- $\beta$ 1-Stimulation, lag jedoch insgesamt im Bereich der knorpelständigen Zellen (Abb. 34 C).

## 5.2 Untersuchungen zum Wirkprofil von TGF- $\beta$ 1 im angewandten Modell

### 5.2.1 Expression des TGF- $\beta$ -Rezeptors II auf humanen und bovinen Chondrozyten

Um initial die theoretische Reaktionsfähigkeit der Chondrozyten auf eine Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 einschätzen zu können, wurden bovine ( $n = 3$ ) sowie humane ( $n = 6$ ) Chondrozytenproben nach Isolation aus dem Knorpel und fünftägiger Adhärenz in Kultur (P0) bezüglich der Oberflächenexpression des membranständigen TGF- $\beta$ RII untersucht.

Die FACS-Analyse ergab einen Anteil von  $33,2 \pm 4,8\%$  TGF- $\beta$ RII<sup>+</sup> boviner und  $16,4 \pm 6,7\%$  humaner Chondrozyten (Abb. 35 A). Die Auswertung erfolgte jeweils anhand des Fluoreszenz-histogramms, welches in Abb. 35 B beispielhaft für eine bovine Chondrozytenprobe dargestellt ist.



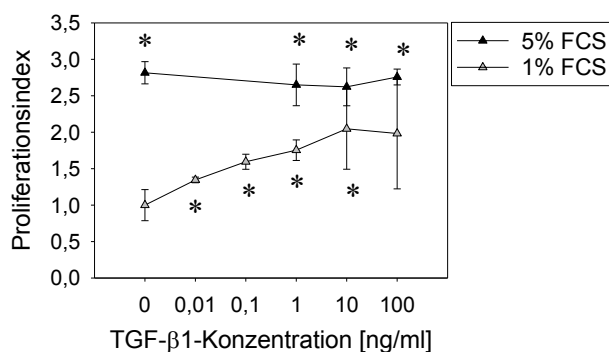
**Abb. 35: Expression des TGF- $\beta$ -Rezeptors II auf humanen und bovinen Chondrozyten.** (A) Relativer Anteil TGF- $\beta$ RII exprimierender Zellen innerhalb boviner ( $n = 3$ ) und humaner ( $n = 6$ ) Chondrozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. (B) Überlagerungs-Histogramm zur Expression von TGF $\beta$ RII auf bovinen Chondrozyten. Die Abszisse gibt die relative Fluoreszenzintensität wieder, auf der Ordinate ist die Zellzahl aufgetragen. Durch die Platzierung von Grenzmarkern und anschließende Subtraktion der Isotypkontrolle (violett) konnte der Anteil positiver Zellen bestimmt werden.

## 5.2.2 Proliferation isolierter Chondrozyten unter TGF- $\beta$ 1-Stimulation

Neben der Untersuchung einer zusätzlichen TGF- $\beta$ 1-Stimulation bezüglich der chondralen Matrixsynthese im *In vitro*-Modell wurde auch der spezifische Einfluss des Wachstumsfaktors auf die Proliferation von isolierten Chondrozyten untersucht. Sowohl bovine (Modellspezies, n = 4) als auch humane Knorpelzellen (Zielspezies, n = 8) wurden hierzu nach einer 48-stündigen „Starving“-Periode in Medium mit 1% FCS mit verschiedenen TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen stimuliert und ihre Zellteilungsrate anschließend im BrdU-Assay vermessen. Sowohl für isolierte humane als auch für bovine Chondrozyten konnte eine deutliche Induktion der Proliferation durch TGF- $\beta$ 1 detektiert werden. Dabei war die Steigerungsrate in beiden Fällen von der eingesetzten TGF- $\beta$ 1-Konzentration abhängig.

### 5.2.2.1 Bovine Chondrozyten

Bovine Chondrozyten reagierten auf eine Steigerung der Zytokinkonzentration im Medium (1% FCS) mit einem nahezu linearen Anstieg der Zellteilungsrate von 20 bis 30% je Stimulus. Die maximale Induktion der Proliferation auf den 2,1-fachen Ausgangswert wurde unter 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 erreicht (Abb. 36).



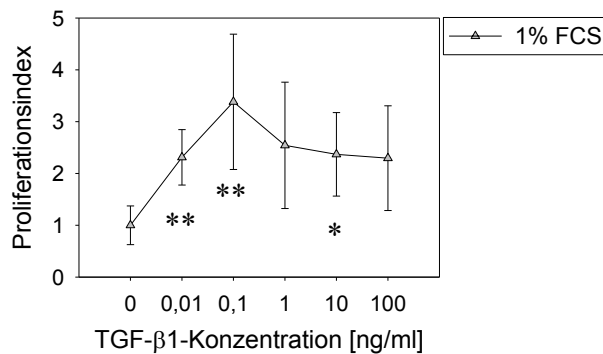
**Abb. 36: BrdU-Proliferationsassay nach 48-stündiger TGF- $\beta$ 1-Stimulation boviner Chondrozyten.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus jeweils 4 bovinen Chondrozytenproben unter Standard- (5% FCS) und „Starving“-bedingungen (1% FCS); Proliferationsindex = absolute Proliferationsrate der Probe/ Proliferationsrate der unstimulierten, gestarvten Chondrozyten. \*p < 0,05 im Vergleich zu den unstimulierten, gestarvten Proben.

Ein Standardserumanteil von 5% bewirkte in den gleichen Analysen allerdings eine massive, die Wirkung von TGF- $\beta$ 1 deutliche übertreffende Steigerung der Zellteilung, die wachstumsfaktorunabhängig etwa das 3,0-fache des Ausgangsniveaus erreichte.

### 5.2.2.2 Humane Chondrozyten

Auch in humanen Chondrozyten wurde die Zellproliferation durch TGF- $\beta$ 1 deutlich und konzentrationsabhängig induziert. Das Maximum der Steigerung wurde hier allerdings schon bei Stimulation mit 0,1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 mit einer Zunahme der Zellteilung bis auf das 3,4-

fache Ausgangsniveau erreicht (Abb. 37). Bei einer weiteren Erhöhung der Wachstumsfaktorkonzentration nahm der mitogene Effekt von TGF- $\beta$ 1 eher wieder ab. Der Proliferationsindex erreichte dann ein Plateau beim 2,5-fachen des Ausgangswertes.



**Abb. 37: BrdU-Proliferationsassay nach 48-stündiger TGF- $\beta$ 1-Stimulation humaner Chondrozyten.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus jeweils 8 humanen Chondrozytenproben unter „Starving“-Bedingungen (1% FCS); Proliferationsindex = absolute Proliferationsrate der Probe/ Proliferationsrate der unstimulierten, gestarvten Chondrozyten. \* $p < 0,05$  im Vergleich zu den unstimulierten, gestarvten Proben.

### 5.2.3 Chemotaxis isolierter Chondrozyten unter TGF- $\beta$ 1-Stimulation

Um zu klären, ob ein TGF- $\beta$ 1-Zusatz die Rekrutierung von Chondrozyten aus der Knorpelmatrix spezifisch unterstützt, wurden in Kooperation mit TransTissueTechnologies (Berlin) Chemotaxis-Assays mit isolierten bovinen und humanen Chondrozyten durchgeführt. Neben TGF- $\beta$ 1 wurden außerdem verschiedene Chemokine und allogenenes Serum bezüglich ihrer rekrutierenden Effekte analysiert.

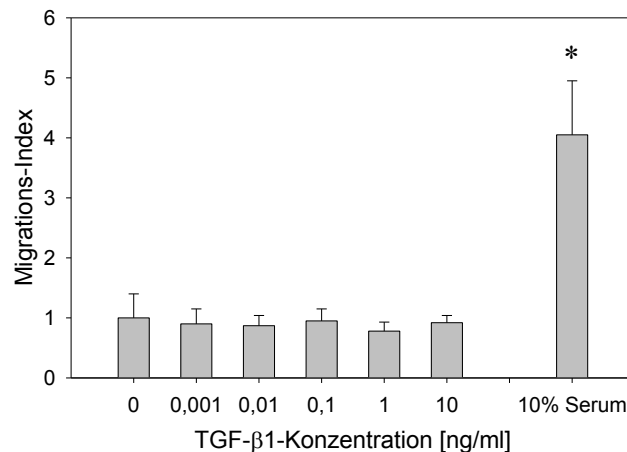
#### 5.2.3.1 Bovine Chondrozyten

Rekombinantes TGF- $\beta$ 1 zeigte auf bovine Chondrozyten keinerlei chemotaktische Wirkung. Für keine der untersuchten TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen wurde eine statistisch signifikante Steigerung des Migrations-Indexes nachgewiesen (Abb. 38). Als potentestes Attraktans der Testreihe erwies sich bovines Serum, das in einer Konzentration von 10% den Migrations-Index gegenüber der Negativkontrolle signifikant um das 4,0-fache steigern konnte und daher für alle Versuchsreihen als Positivkontrolle mitgeführt wurde.

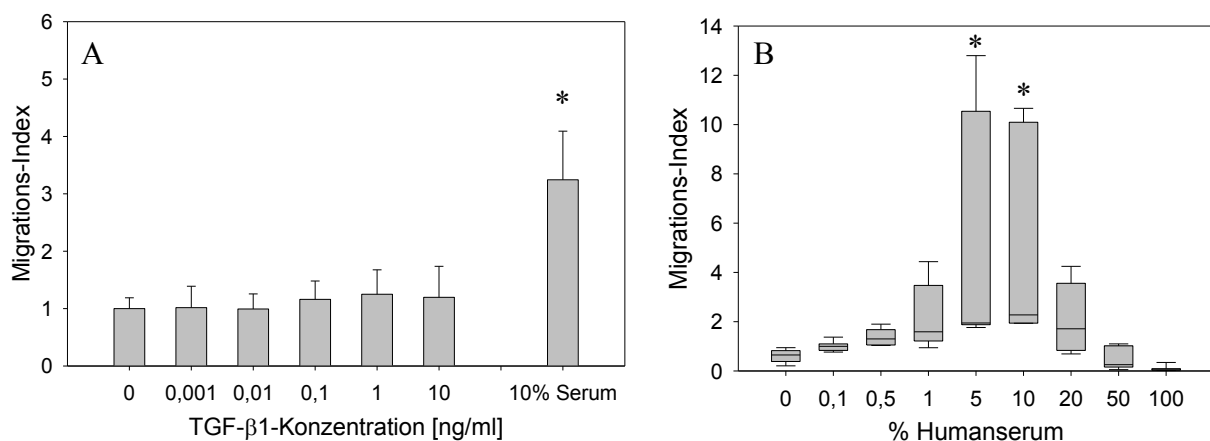
#### 5.2.3.2 Humane Chondrozyten

Auch in den Proben humaner Chondrozyten wurde der Migrations-Index durch Anwesenheit von TGF- $\beta$ 1 im Vergleich zur Negativkontrolle nicht signifikant gesteigert (Abb. 39 A). Die Rekrutierung humaner Knorpelzellen durch verschiedene Chemokine erwies sich ebenfalls als äußerst schwach ausgeprägt und zeigte nur für einzelne Vertreter (SDF1a/CXCL12, TECK/CCL25) konzentrationsabhängige, signifikante Unterschiede gegenüber der

Negativkontrolle (Daten nicht gezeigt). Wiederum wurde allogenes Serum als effektivstes Chemoattraktans der Testreihe identifiziert, das im Konzentrationsbereich von 5 bzw. 10% eine maximale Anlockung der Zellen bis auf das 10-fache der Kontrolle induzierte (Abb. 39 B).



**Abb. 38: Rekrutierung boviner Chondrozyten unter TGF-β1-Stimulation.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM (n = 3). Migrations-Index = Anzahl migrierter Zellen pro Stimulus / Anzahl migrierter Zellen in der Negativkontrolle. \*p<0,05 gegenüber Negativkontrolle (Medium mit 0,01% Serum). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von TransTissueTechnologies.



**Abb. 39: Rekrutierung humaner Chondrozyten unter Stimulation mit TGF-β1 (A) bzw. allogenem Serum (B).** \*p<0,05 gegenüber Negativkontrolle (Medium mit 0,01% Serum). Abbildung mit freundlicher Genehmigung von TransTissueTechnologies.

#### 5.2.4 Eigengehalt von TGF-β1 in fetal-bovinem und humanem Serum

Um den Effekt einer zusätzlichen externen TGF-β1-Stimulation im Modell einschätzen zu können, wurde mittels ELISA untersucht, welchen mittleren Gehalt des Wachstumsfaktors TGF-β1 die für die dargestellten Versuche verwendeten Sera per se aufweisen.



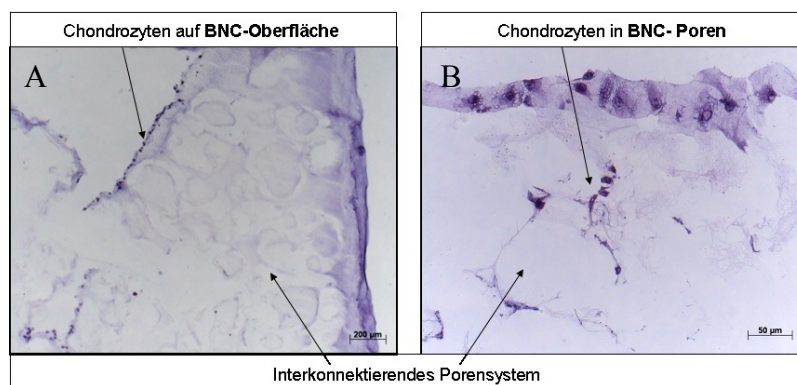
Dabei ergab sich eine TGF- $\beta$ 1-Konzentration von  $2,89 \pm 1,44$  ng/ml für humanes Serum. Der Gehalt des Wachstumsfaktors in handelsüblichem FCS war dagegen mit  $1,07 \pm 0,02$  ng/ml etwas niedriger.

### 5.3 Zellbesiedlung verschiedener Typen modifizierter BNC

Wie die Ergebnisse aus dem Regenerationsmodell zeigten, können unmodifizierte Cellulose-Vliese nur oberflächlich von Zellen besiedelt werden. Um eine für die erfolgreiche Produktentwicklung unverzichtbare dreidimensionale Besiedlung des BNC-Netzwerkes mit Chondrozyten zu erreichen, unternahm der Kooperationspartner Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG große Anstrengungen zur Schaffung eines optimierten Porensystems, dessen Erfolg im Rahmen dieser Arbeit durch Zellbesiedlungsexperimente quantifiziert wurde.

#### 5.3.1 Porogen-modifizierte BNC

Entscheidende Verbesserungen der nativen Netzwerkstruktur wurden zunächst durch den Einsatz von Porogenen (aus Gelatine- und Paraffin-*"Microspheres"*) erzielt, die zur Entstehung mikroporöser Cellulose-Schichten mit interkonnektierenden Porensystemen und deutlich gesteigerter Einzelporengröße führten (Abb. 40 A).



**Abb. 40: Besiedlung von mit Gelatine-Porogenen modifizierter Cellulose mit humanen Chondrozyten nach 24 h Kultivierungsdauer.** Dünnschnittpräparate nach HE-Anfärbung. Originalvergrößerung 40x (A), 200x (B). Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG.

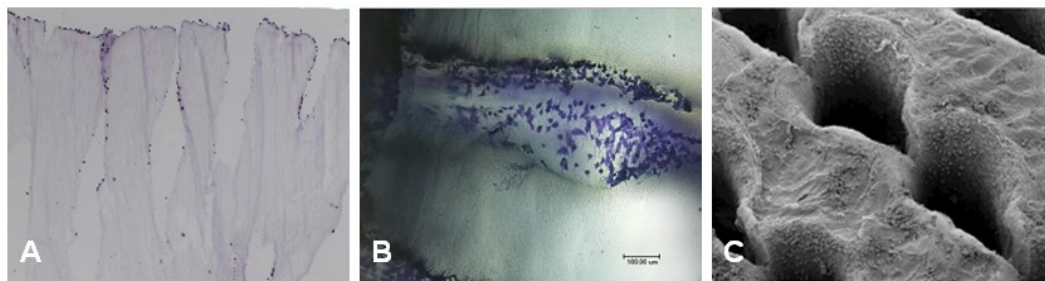
Ein Einwandern von Zellen war prinzipiell möglich. Chondrozyten waren bis zu einer Tiefe von 200  $\mu$ m eindeutig nachzuweisen und erreichten damit eine im Vergleich zu nativer BNC deutlich höhere Infiltrationstiefe (Abb. 40 B). Verglichen mit der initial applizierten Menge und der an der Oberfläche anhaftenden Chondrozyten war die Anzahl der detektierten Chondrozyten im Inneren des Materials jedoch verhältnismäßig gering. Strukturelle

Untersuchungen der Porogen-modifizierten BNC mittels REM und Laserscanningmikroskopie (LSM) zeigten wie schon bei nativer BNC eine dünne, aber sehr dichte Membran (Daten nicht gezeigt), die den direkten oberflächlichen Zugang zu den in der BNC liegenden Poren teilweise verschloss, wodurch der ungehinderte Zugang der Zellen zu den porenhaltigen BNC-Bereichen nur eingeschränkt möglich war.

### 5.3.2 Laser-modifizierte BNC

Eine zweite erfolgversprechende Möglichkeit zur Schaffung eines dreidimensional besiedelbaren BNC-Implantates stellt die postmodifikative Laserbehandlung dar. Die auf diese Weise generierten Cellulose-Vliese zeichnen sich durch kanalartige, das gesamte Implantat durchdringende Hohlraumstrukturen mit einem mittleren Durchmesser von 200  $\mu\text{m}$  aus.

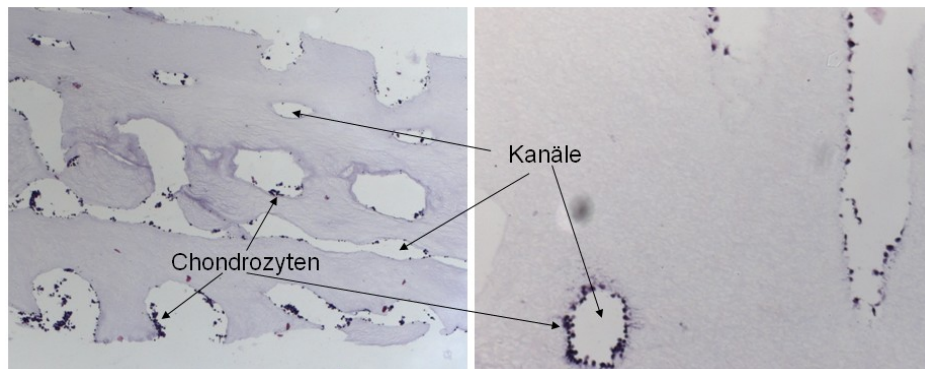
In der ersten Versuchsphase wurde die Schaffung eindimensionaler, vertikal ausgerichteter Laserkanäle mit einem mittleren Kanalabstand von 600  $\mu\text{m}$  in Zellbesiedlungsexperimenten getestet. Dabei konnte erstmals im Rahmen der Untersuchungen eine das gesamte Implantat durchdringende Besiedlung der BNC dokumentiert werden (Abb. 41).



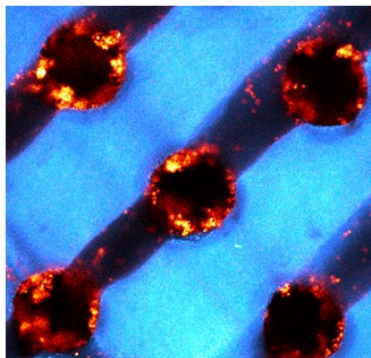
**Abb. 41: Kanalstrukturen eindimensional gelasierter BNC-Implantate nach Chondrozytenbesiedlung und 24 h statischer Kultur.** (A) Histologisches Schnittpräparat nach HE-Färbung (Querschnitt). Originalvergrößerung: 40x. (B) Digitale Auflichtmikroskopie nach Toluidin-Blau-Färbung (Querschnitt). (C) REM-Aufnahme (Aufsicht). Durch alle drei Nachweismethoden sind deutlich Zellen auf der Implantatoberfläche und an der Innenwandung der Kanalstrukturen zu erkennen. Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG.

Da sich die biomechanischen Eigenschaften des BNC-Materials durch das Einbringen eindimensionaler Kanalstrukturen gegenüber nativer Bakteriencellulose in ersten Tests nicht wesentlich verschlechterten (manuelle Nahtausreiß- und Kompressionsversuche; Daten nicht gezeigt), wurde diese Strategie weiterverfolgt und der Projektpartner Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG konnte im weiteren Verlauf dreidimensional gelaserte BNC-Implantate zur *In vitro*-Zellbesiedlung zur Verfügung stellen. Aufgrund der enormen mechanischen Stabilität der BNC-Fasern war es möglich, Laserkanäle nicht nur vertikal zur Implantatoberfläche zu

generieren, sondern ebenfalls in horizontaler und sagittaler Ausrichtung, ohne dabei die Grundfestigkeit des Implantates zu verlieren.



**Abb. 42:** Histologische Schnittpräparate eines dreidimensional gelaserten BNC-Implantates nach Chondrozytenbesiedlung und 24 h dynamischer *In vitro*-Kultur. HE-Färbung. Originalvergrößerung 40x (links), 100x (rechts).

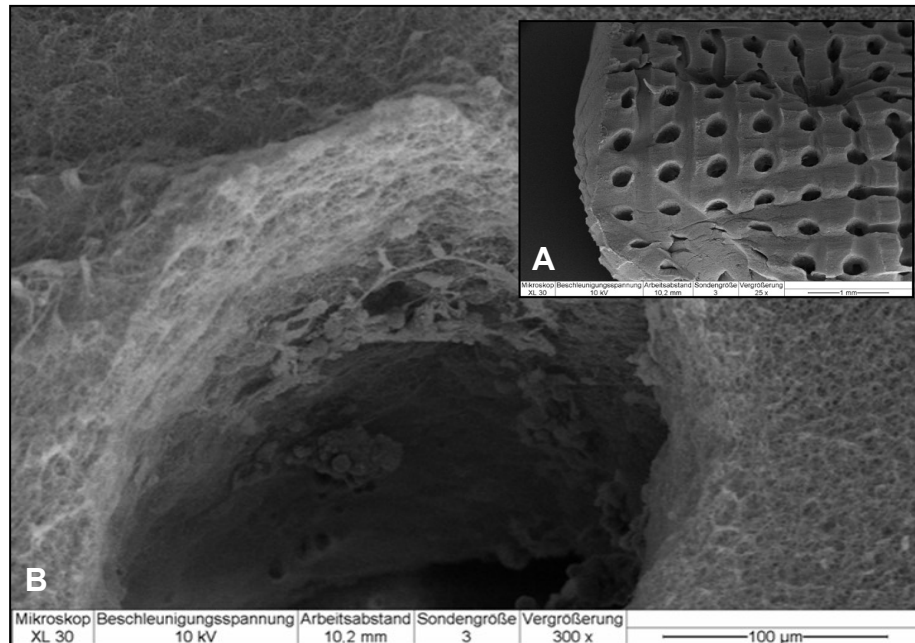


**Abb. 43:** Laserscanningmikroskopische Aufnahme eines dreidimensional gelaserten BNC-Implantates nach Chondrozytenbesiedlung und 24 h dynamischer *In vitro*-Kultur (Aufsicht). Die Zellen wurden zuvor mit CellTracker™ Orange (orange), die BNC mit DTAF (blau) markiert.

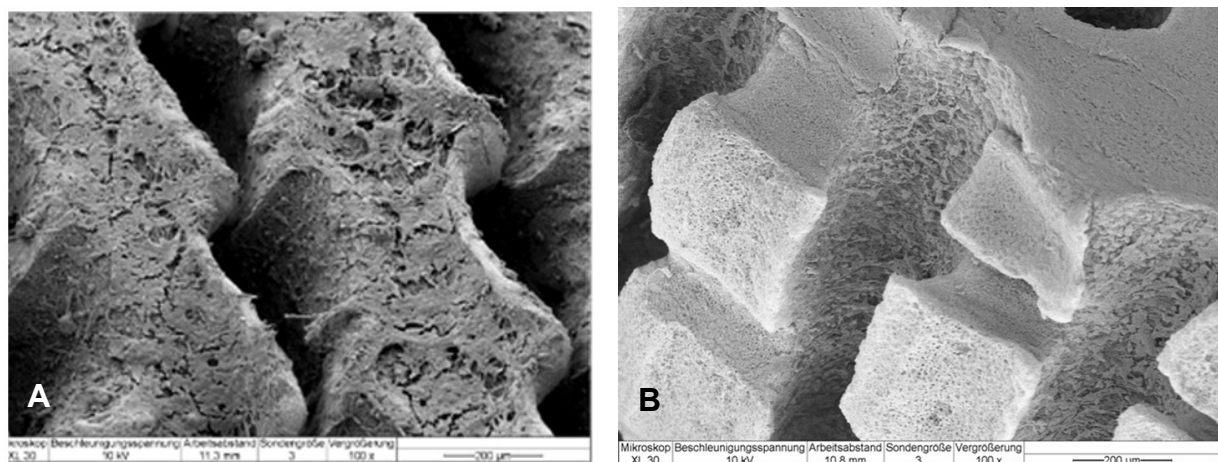
Es zeigte sich bereits nach 24 h *In vitro*-Kultur, dass sich die dreidimensional modifizierten BNC-Vliese optimal mit isolierten Zellen besiedeln ließen. In allen mikroskopischen Nachweisverfahren (Lichtmikroskopie, LSM, REM; Abb. 42-44) wurde eine z.T. flächige Chondrozytenbesiedlung der Innenflächen aller Kanaldimensionen nachgewiesen. Die Zellen wiesen dabei zum größten Teil noch sphärische Formen auf. V.a. unter dynamischer Kultivierung (kontinuierliche Bewegung der BNC) wurde eine homogene Verteilung der Zellen bis in die innersten BNC-Schichten erreicht, wobei die Außenflächen der Implantatkörper weniger mit Zellen besiedelt waren als bei statisch kultivierten Proben.

Nach 7 d *In vitro*-Kultur wurde mittels REM-Untersuchungen in allen Laser-modifizierten BNC-Implantaten eine massive Ablagerung von EZM auf den Kanalflächen nachgewiesen, die durch die applizierten und adhärennten Zellen gebildet worden war. Der Großteil der

Chondrozyten hatte als Zeichen seiner Adhärenz eine abgeflachte Zellform angenommen. Die feine Nanostruktur der BNC war an vielen Stellen von kompakt erscheinenden EZM-Fasern überlagert (Abb. 45).



**Abb. 44: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines dreidimensional gelaserten BNC-Implantates nach Chondrozytenbesiedlung und 24 h dynamischer *In vitro*-Kultur.** (A) Übersichtsaufnahme zur dreidimensionalen Anordnung der Laserkanäle. Originalvergrößerung: 25x. (B) Aufsicht auf die zellbesiedelte Innenfläche eines sagittalen Laserkanals. Originalvergrößerung: 300x. Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG.



**Abb. 45: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen Laser-modifizierter BNC-Implantate nach Chondrozytenbesiedlung und 7 d *In vitro*-Kultur.** Die Ausbildung einer extrazellulären Matrix auf den Kanalflächen ist sowohl bei eindimensional gelaserten, statisch kultivierten BNC-Vliesen (A) als auch bei dreidimensional gelaserten, dynamisch kultivierten Vliesen (B) deutlich erkennbar. Originalvergrößerung: 100x. Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG.

## 6 DISKUSSION

Defekte des Gelenkknorpels stellen aufgrund ihrer äußerst begrenzten Selbstheilungskapazität ein gefürchtetes medizinisches Problem dar. Neben der erheblichen individuellen Belastung des Patienten im Sinne von Schmerzen und fortschreitender Degeneration der Gelenkoberfläche entwickeln sich primäre und sekundäre arthrotische Prozesse mehr und mehr zu einer ernstzunehmenden sozioökonomischen Belastung. Bestrebungen auf dem Gebiet der regenerativen Forschung führten in den letzten Jahrzehnten zur Entwicklung einer Vielzahl invasiver Methoden mit dem Ziel der Reparatur des defekten Knorpelareals. Das Verständnis grundlegender Mechanismen der Knorpelregeneration stellt dabei die Basis für die Schaffung und Gestaltung optimaler Knorpelersatzmaterialien dar.

### 6.1 *In vitro*-Knorpelregenerationsmodell

Grundlegende Mechanismen der regenerativen Knorpeltherapie wurden bisher v.a. mithilfe verschiedener Tiermodelle untersucht. Dabei hat sich neben Ziege (Ahern et al. 2009), Kaninchen (Jansson et al. 2000), Pferd (Ahern et al. 2009) und Minipig (Gelse et al. 2008) v.a. das Schaf als Modellspezies der orthopädischen Forschung etabliert (Allen et al. 1998, Erggelet et al. 2007, Jubel et al. 2008, Munirah et al. 2007, Oakley et al. 2004). Die Evaluierung von Wirksamkeit und Sicherheit potentieller Implantate im Tiermodell ist ohne Frage essentiell, um die spätere klinische Applikation realisieren zu können. V.a. die hohe Komplexität, interindividuelle Unterschiede, ein hoher Zeit- und Kostenaufwand sowie zahlreiche ethische Probleme hinsichtlich des Tierschutzes sind jedoch generelle Nachteile, die bei der Anwendung solcher *In vivo*-Modelle bedacht werden sollten. Ein Fokus der vorliegenden Arbeit lag daher auf der Entwicklung eines alternativen *In vitro*-Knorpelregenerationsmodells mit dem Ziel, ein standardisiertes, robustes und universal anwendbares System zu schaffen, mit dessen Hilfe ein vorbereitendes Screening potentieller Knorpelersatzmaterialien im Sinne eines „*Proof of concept*“ vor anschließender Testung im Tierexperiment ermöglicht werden soll.

#### 6.1.1 Vorteile des entwickelten *In vitro*-Knorpelregenerationsmodells

Bisher existieren nur wenige publizierte sog. Explantat-Modelle, die unmittelbar die *In vitro*-Regeneration von Knorpelgewebsdefekten untersuchen und von denen sich das hier entwickelte Regenerationsmodell in einigen wesentlichen Punkten unterscheidet. Dies betrifft zum einen die verwendete Knorpelmatrix, v.a. aber die Dauer der Explantatkultivierung sowie

die vordergründige Fragestellung des jeweiligen Experiments. Die in den letzten Jahren publizierten Explantat-Modelle zur Knorpelregeneration dienten in erster Linie der Evaluation des regenerativen Potentials isolierter Chondrozyten (Enders et al. 2010, Madry et al. 2001, Secretan et al. 2010) bzw. MSC (Iwai et al. 2011, Vinardell et al. 2009), die nach entsprechender Vorkultivierung als Zellsuspension im Sinne einer Chondrozytentransplantation in den Defekt des Knorpelimplantats eingebracht wurden. Eine zweite Fragestellung war die Untersuchung der *In vitro*-Integration gezüchteten Knorpels (*tissue engineered cartilage*, TE-Knorpel) in den Gelenkknorpel (Hunter und Levenston 2004, Obradovic et al. 2001, Theodoropoulos et al. 2011). Allen bisher etablierten Modellen gemeinsam war jedoch die Defektfüllung mit zellhaltigen Substanzen. Über den Einsatz völlig zellfreier Scaffoldmaterialien existieren bislang hingegen relativ wenige Informationen. Die Füllung eines Knorpeldefektes mit einem zellfreien Knorpelersatzmaterial wie BNC scheint bei der Verwendung eines *ex vivo*-Modells daher ein völlig neuer Ansatzpunkt zu sein. Mittels des beschriebenen Modells erscheint es möglich, die endogene Regenerationskapazität der defektnahen Chondrozyten *in situ* ohne vitale Unterstützung aus dem Füllmaterial hinsichtlich Zellmigration und Syntheseaktivität zu analysieren und damit entsprechend grundlegende Erkenntnisse auf dem Gebiet der zellfreien Knorpelersatzmaterialien zu gewinnen.

Wie bereits beschrieben regeneriert Gelenkknorpel aufgrund seiner Avaskularität und seiner Zellarmut nur begrenzt und sehr langsam. Mithilfe der bisher publizierten Modelle konnten aufgrund der relativ kurzen Kulturdauern zwischen fünf Tagen (Madry et al. 2001), 28 Tagen (Secretan et al. 2010) und maximal sechs Wochen (Hunter und Levenston 2004, Vinardell et al. 2009) lediglich initiale Reaktionen mit Regenerationstendenzen abgeleitet werden, nicht jedoch Aussagen über das längerfristige Reparaturbestreben des Knorpels getroffen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die gewählten Kulturbedingungen durchaus in der Lage sind, die Gewebshomöostase über deutlich längere Zeiträume aufrechtzuerhalten. Damit scheint ein *ex vivo*-Modell entwickelt worden zu sein, dessen Anwendung v.a. für Langzeitkulturen von entscheidendem Vorteil ist, die nicht auf die im Rahmen dieser Studie vorgegebenen 8 Wochen beschränkt sind. In weiterführenden Projekten der eigenen Arbeitsgruppe wurde der Kulturzeitraum bereits erfolgreich auf 10 bzw. 12 Wochen verlängert (Ruediger et al. 2011).

Auch das im Modell verwendete bovine Knorpelmaterial bietet eine Reihe von Vorteilen. Durch seine regelmäßige Verfügbarkeit in gleichbleibender Qualität kann der Einsatz einer standardisierten homogenen Probenmatrix mit hoher Probenanzahl gewährleistet werden. Die

Beschaffung humanen Probenmaterials (Enders et al. 2010, Secretan et al. 2010) in entsprechender Menge gestaltet sich ungleich schwieriger und der gewonnene Knorpel wäre hinsichtlich seiner Qualität von großen interindividuellen Unterschieden geprägt. Der verwendete Knorpel stammt aus jungen, adulten Rindern und zeigt weder einen primären PG-Verlust noch oberflächliche Fissuren. Somit kann von gesundem Probenmaterial ohne initiale Schädigung ausgegangen werden, was die Untersuchung des Einflusses der Langzeitkulturbedingungen bzw. Stimulationen auf Knorpelintegrität und Matrixhomöostase deutlich erleichtert.

### 6.1.2 Wahl der Versuchsbedingungen

Abnehmende Proliferationsraten und Dedifferenzierungsvorgänge stellen essentiell begrenzende Faktoren bei der *In vitro*-Kultur von Chondrozyten bzw. Knorpelgewebe dar. Um diese Prozesse im angestrebten Regenerationsmodell langfristig zu inhibieren, war die Supplementation des Basalmediums mit einem gewissen Anteil an tierischem Serum (*fetal calf serum*, FCS) unerlässlich. In der Literatur ist die Teilungsunfähigkeit von Chondrozyten unter serumfreien Bedingungen (Chua et al. 2005, Mandl et al. 2002) ebenso wie die konzentrationsabhängige Proliferationsinduktion unter FCS-Zusatz (Choi et al. 1980, Chua et al. 2005, Hu et al. 2002) mehrfach belegt. Weiterhin gewährleistet die Gegenwart von Serum im Basalmedium boviner Knorpelkulturen die Aufrechterhaltung eines nahezu konstanten PG-Gehaltes in der Matrix über mehrere Wochen, während unter Serumentzug ein anhaltender Verlust des PG-Nettogehaltes im Gewebe zu verzeichnen ist (Hascall et al. 1983). Darüber hinaus scheint FCS konzentrationsabhängig auch in der Lage zu sein, die chondrogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen während ihrer *In vitro*-Expansion zu induzieren (Yokoyama et al. 2008). Aufgrund einiger bedeutender Nachteile im Gebrauch von tierischem Serum wurde im Rahmen dieser Arbeit der FCS-Zusatz zum Knorpelmedium jedoch gezielt vom bisher etablierten Standardanteil von 10% (Freed et al. 1994, Gomez-Camarillo et al. 2009, Mandl et al. 2002, Martin et al. 1999, Vunjak-Novakovic et al. 1998, Yokoyama et al. 2008) auf lediglich 5% reduziert. Neben der Frage nach der ethischen Vertretbarkeit seiner Gewinnung sprachen dabei v.a. die undefinierte, wechselnde Zusammensetzung von FCS als Naturprodukt und der schwankende Gehalt seiner Inhaltsstoffe (Aminosäuren, Kohlenhydrate, anorganische Salze, Vitamine, Spurenelemente, Hormone, makromolekulare Wachstumsfaktoren) mit schlechter Reproduzierbarkeit für seine Reduktion im Basalmedium. Als partieller Serumersatz diente stattdessen die kommerziell



erhältliche und bereits etablierte Supplementkombination Insulin-Transferrin-Selenium (ITS). Chua *et al.* zeigten bereits, dass der Zusatz von ITS unter gleichzeitiger Serumreduktion auf bis zu 2% FCS in den frühen Passagen von humanen nasalen Septumchondrozyten annähernd gleiche Proliferationsraten wie unter alleiniger Stimulation mit 10% FCS bewirkt und gleichzeitig signifikant den Dedifferenzierungsprozess der kultivierten Chondrozyten unterdrückt (Chua et al. 2005). Andere Autoren konnten bei der Zellkultur juveniler boviner Chondrozyten in dreidimensionalen Hydrogelen sogar unter maximaler Reduktion des Serums auf 0,2% FCS + ITS bezüglich Zellteilung und Matrixsynthese ähnliche Trends wie unter 10%iger Serumstimulation beobachten. Allerdings wurde im Rahmen dieser Studie unter der höheren Serumkonzentration ein vermehrtes Auswachsen von Chondrozyten mit flächiger Adhärenz auf der Scaffoldoberfläche beobachtet, währenddessen ein niedriger Serumanteil (0,2%) + ITS dieses Auswachsen eher zu hemmen schien (Kisiday et al. 2005).

Die Verwendung von 5% FCS im Basalmedium im Rahmen dieser Arbeit reichte nachweislich aus, um das beschriebene Phänomen des zellulären Auswachsens unter Serumstimulation ausreichend zu unterstützen, was sich für das Konzept zellfreier Knorpelersatzimplantate und deren *In situ*-Besiedlung mit migrierten, knorpeligen Chondrozyten als durchaus vorteilhaft erwies. Gleichzeitig lag der FCS-Anteil noch deutlich über dem von Chua *et al.* beschriebenen Proliferationsminimum von 2%, so dass der mitogene Effekt der Serumstimulation auf jeden Fall gewahrt blieb.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die gewählte Supplementkombination aus 5% FCS + ITS optimale Kulturbedingungen bietet, um die Gewebshomöostase von Knorpelimplantaten auch *in vitro* langfristig aufrechtzuerhalten. Selbst nach 8 Wochen Gewebeskultur war weder ein Verlust knorpelspezifischer Markermoleküle noch ein Einsetzen dedifferenzierender Prozesse detektierbar. Als Referenz für alle gemessenen Marker wurden zu jedem Zeitpunkt bewusst die Ausgangswerte des frisch isolierten Knorpels gewählt. Hintergrund dieser Entscheidung war das Bestreben, ein *In vitro*-Modell zu entwickeln, dessen Kulturbedingungen dem Umgebungsmilieu *in vivo* in ausreichendem Maße ähneln, um den natürlichen endogenen Regenerationsprozess im Gelenkknorpel bestmöglich imitieren und nachvollziehen zu können.

Wie bei allen bisher publizierten Explantat-Modellen zeigten sich jedoch auch in diesem Fall hinsichtlich der Regenerationsgeschwindigkeit bestimmte Limitationen. Die zur initialen Modelletablierung gewählten einfachen, statischen Kulturbedingungen gilt es in zukünftigen Studien entsprechend zu optimieren, wobei v.a. die Ergänzung mechanischer Stimuli in Frage



kommt, die die Geschwindigkeit der Knorpelregeneration durchaus weiter steigern könnten (Grodzinsky et al. 2000, Larsson et al. 1991, Suh et al. 1999).

### 6.1.3 Mobilisierung knorpelständiger Chondrozyten

Die prinzipielle Fähigkeit hyaliner Chondrozyten zur Zellmigration wurde in einer Reihe von Arbeiten bereits beschrieben (Chang et al. 2003, Frenkel et al. 1996, Gosiewska et al. 2001, Morales 2007). V.a. isolierte Chondrozyten scheinen dabei grundsätzlich in der Lage zu sein, auf äußere Stimuli zu reagieren und den klassischen Ablauf der Zellmigration mit den folgenden Einzelschritten in Gang zu setzen: (1) Polarisierung des Zellkörpers in Richtung des Stimulus, (2) Ausbildung gerichteter Zellausläufer (Pseudopodien), (3) Adhäsionsregulation, (4) Kontraktion der Zellkörpers und (5) Ablösung des hinteren Zellpols von der Umgebung. Die allgemein unzureichende Regenerationsfähigkeit des adulten hyalinen Knorpelgewebes scheint also kein Problem einer grundsätzlichen Migrationsunfähigkeit der Chondrozyten zu sein. Vielmehr stellte sich im Rahmen dieser Arbeit die Frage, wie bzw. ob knorpelständige Chondrozyten überhaupt in der Lage sind, die Dichte der sie umgebenden EZM zu überwinden, um sich aus dem Gewebsverband mobilisieren zu können.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Mobilisierung defektnaher Chondrozyten aus dem Nativgewebe grundsätzlich möglich ist und lassen ein Zusammenspiel aus passiver Gewebsdegradation im Laufe der Langzeitkultur und aktiver Migrationsprozesse von Seiten der Chondrozyten als Voraussetzung für eine gerichtete Zellbewegung in den Defekt vermuten. Der dabei beobachtete Zusammenhang zwischen zunehmender oberflächlicher *Lamina splendens*-Ablösung im Laufe der Gewebeskultur und davon abhängiger Chondrozytenmotilität scheint die entscheidende Verbindung zwischen passiver Gewebsdegradation und aktiver Zellmigration zu sein. Für die oberflächliche Knorpeldelamination werden proteolytisch aktive Enzyme wie Aggrecanasen und MMP verantwortlich gemacht, die nicht nur bei entzündlichen oder degenerativen Prozessen freigesetzt, sondern auch im Rahmen des normalen Gewebsumbaus in geringen Konzentrationen kontinuierlich von den Chondrozyten sezerniert werden (Chubinskaya et al. 2001, Schmitz et al. 1996). Interessanterweise konnten im Rahmen dieser Arbeit mobile Chondrozyten nur in Bereichen delaminierten Knorpels beobachtet werden, währenddessen in Bezirken mit intakter Knorpeloberfläche kein Auswachsen knorpelständiger Zellen zu beobachten war. Gleiches wurde bereits für ein anderes Knorpelimplantat-Modell in Bezug auf die zelluläre Anhaftung beschrieben (Secretan et al. 2010). Unter Berücksichtigung der

Hypothese, dass Knorpel-PG sowohl die zelluläre Anhaftung (Hunziker und Rosenberg 1996, Winnemoller et al. 1991) als auch Migration (Davies et al. 2008) in entscheidendem Maße inhibieren, erscheinen diese Beobachtungen nicht überraschend: Oberflächlich geschädigte Knorpelareale ermöglichen das Auswaschen der inhibierenden PG aus der Matrix und damit den Übergang zur aktiven Migration (bevorzugt in der superfizialen Knorpelschicht).

Für die aktive Zellmigration der Chondrozyten innerhalb der kompakten Knorpelmatrix wirken grundsätzlich zwei verschiedene Invasionsstrategien plausibel: Zunächst scheint die für andere Zelltypen bereits gut dokumentierte, gezielt membrangebundene Expression von proteolytischen Enzymen am führenden Zellpol eine Eröffnung der Chondrozytenhöhlen mit gerichtetem Austritt der betroffenen Zellen ins umgebende Gewebe zu ermöglichen (Estreicher et al. 1990, Werb 1997, Yebra et al. 1996). Andererseits wurde ein als „*contact guidance*“ bezeichneter, Proteolyse-unabhängiger Mechanismus als gerichtete Lokomotion motiler Zellen entlang der matrixeigenen Kollagenfasern beschrieben (Brown 1982, Dunn und Ebdal 1978). Demnach sind auch Chondrozyten zur vollständigen Interaktion mit dem sie umgebenden Kollagennetzwerk in der Lage, indem sie über die Ausbildung zahlreicher Zellfortsätze mit den Kollagenfasern in Kontakt treten und ihre Zellkörper mit den einzelnen Fibrillen „umwickeln“ (Lee und Loeser 1999).

Sowohl die eigenen Ergebnisse als auch Arbeiten aus der Literatur (Lyman et al. 2000) unterstützen die Hypothese, dass der Verlauf der einzelnen Kollagenfibrillen als Leitscheine der Chondrozytenbewegung dient. Interessanterweise erschienen Zellmigration und resultierende Hypozellularität in jenen Knorpelarealen am stärksten ausgeprägt zu sein, in denen die Kollagenfibrillen der EZM senkrecht zur Schnittkante des Defektes oder parallel zur Knorpeloberfläche ausgerichtet waren, wie es v.a. auf die Superfizialschicht zutrifft. Bezirke, in denen die Kollagenfibrillen eher parallel zur Schnittkante orientiert waren (mittlere Zone), schienen eine Zellmigration zu inhibieren und hielten ihre Zellularität aufrecht (Campbell 1969, DePalma et al. 1966, Newman 1998). Die parallele Ausrichtung der Kollagenfasern in Bezug zur Knorpeloberfläche scheint auch im Falle der vorliegenden Arbeit der Schlüssel zur zielgerichteten Lokomotion der mobilisierten Zellen in Richtung des Defekts gewesen zu sein.

Zusammenfassend scheint die *in vivo* beobachtete, für gewöhnlich unzureichende Reparaturantwort hyalinen Knorpels also kein Problem einer generellen Migrationsunfähigkeit von Chondrozyten zu sein, sondern vielmehr auf zwei anderen wesentlichen Faktoren zu beruhen: (1) dem Mangel an effektiver Zellpolarisation und -migration in Richtung Knorpeldefekt in Arealen mit parallel zum Schnitttrand bzw. senkrecht

zur Oberfläche ausgerichteten Kollagenfibrillen, die den Großteil der Knorpeldicke einnehmen und (2) der insgesamt sehr langsamen Migrationsgeschwindigkeit mobilisierter Chondrozyten auch in Arealen mit adäquater Fibrillenarchitektur.

Ältere Arbeiten zeigen, dass die Geschwindigkeit des *In vitro*-Auswachsens knorpelständiger Chondrozyten durch vorherige enzymatische Behandlung deutlich beschleunigt werden kann. So bewirkte die Präinkubation eines adulten humanen Gelenkknorpelimplantates mit Kollagenase eine Verkürzung des Mobilisationszeitraumes von über 30 auf nur noch drei Tage (Qiu et al. 2000). Diese Erkenntnisse kommen der *In vivo*-Situation von traumatisch oder degenerativ geschädigtem Gelenkknorpel enorm entgegen, in der von erhöhten Konzentrationen an proteolytisch aktiven Enzymen im Gelenkraum ausgegangen werden muss, die wiederum die defektnahen Matrixareale entsprechend andauern und die Chondrozytenfreisetzung ermöglichen und damit den Einsatz eines zellfreien Implantates zusätzlich begünstigen könnten.

#### 6.1.4 Proteoglykane

##### Gesamt-Proteoglykane

Die Evaluierung des Stoffwechsels der Knorpel-PG im Verlauf der *In vitro*-Kultur erbrachte insgesamt vielversprechende Ergebnisse bezüglich der Regenerationsbemühungen des Knorpels. Zunächst konnte mittels lichtmikroskopischer Beurteilung der Knorpel-BNC-Konstrukte ein gravierender substantieller PG-Verlust während der Kultur im Vergleich zu frischem Knorpel selbst an der Knorpeloberfläche und allen Schnittkanten qualitativ nahezu ausgeschlossen werden. Die Hypothese einer mangelnden *In vitro*-Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen wird daher für die gesamte Kulturdauer entkräftet. Die angewendete Färbung mit Safranin-O/Lichtgrün stellt trotz ihrer geringen Sensitivität (Camplejohn und Allard 1988) eine aussagekräftige Methode dar, um die grundlegende Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase unter den besagten Kulturbedingungen prinzipiell zu belegen und ist bis heute in der Knorpelforschung eine allgemein etablierte Methode zum qualitativen Nachweis von PG (Correia et al. 2011, Stark et al. 2006). Zur sensitiven Quantifizierung der im Knorpel enthaltenen PG-Menge wurde der von Chandrasekhar und Mitarbeitern etablierte DMB-Assay angewandt (Chandrasekhar et al. 1987), der auf der Bildung eines metastabilen Komplexes zwischen dem Farbstoff DMB und den GAG-Seitenketten der enthaltenen PG beruht. Der hierbei ermittelte Gehalt von GAG im bovinen Frischknorpel von  $19,2 \pm 1,0$  mg/g FG liegt in der Größenordnung vergleichbarer, bereits publizierter Daten (Voigt et al. 2009, Waters 2007,

Williamson et al. 2003) und spricht für die Zuverlässigkeit der DMB-Methode. Aufgrund der geringen Anzahl publizierter *In vitro*-Modelle zur langfristigen Kultur von Gelenkknorpel konnten an dieser Stelle aber nur wenige Veröffentlichungen zur Diskussion der Ergebnisse herangezogen werden. Die meisten Arbeiten zu Explantatmodellen evaluierten ihre Kulturergebnisse zudem entweder rein histologisch (Enders et al. 2010, Iwai et al. 2011) oder aber beschränkten ihre quantitativen Analysen allein auf die defektfüllende Substanz (Vinardell et al. 2009). Hinzu kommt die in der Literatur uneinheitliche Darstellungsweise der absoluten oder relativen Proteingehalte bezogen auf Nass- bzw. Trockengewicht (Theodoropoulos et al. 2011) des Knorpels, so dass ein Vergleich verschiedener Angaben bei schwankendem Wassergehalt zwischen 60 und 80% nicht ohne weiteres möglich ist.

Nach 2 Wochen in Gewebekultur zeigte der Knorpel beider Versuchsgruppen einen quantitativ gesteigerten Gehalt an PG in der Matrix, so dass davon auszugehen ist, dass der Knorpel auf den initial gesetzten Gewebsdefekt mit einer gesteigerten Matrixsynthese im Sinne eines regenerativen Bestrebens reagiert. Der gegenüber frischem Knorpel erhöhte PG-Gehalt konnte zumindest vom basal stimulierten Knorpel über die gesamte Kulturdauer aufrechterhalten werden. Der PG-Gehalt des TGF- $\beta$ 1-stimulierten Knorpels war zu allen Zeitpunkten niedriger als in der unstimulierten Vergleichsgruppe und fiel entgegen den Erwartungen schnell auf das Ausgangsniveau des Frischknorpels zurück (siehe 5.1.3.1.1).

Bei der Analyse des PG-Gehaltes im Mediumüberstand konnte im Kulturverlauf sowohl für die unstimulierte als auch in der TGF- $\beta$ 1-Gruppe eine kontinuierliche kumulative PG-Freisetzung mit einem Gesamtverlust von  $23,9 \pm 1,1$  mg GAG/g FG (unstimuliert) bzw.  $30,0 \pm 3,2$  mg GAG/g FG (TGF- $\beta$ 1) nachgewiesen werden. In Zusammenschau mit dem fehlenden PG-Verlust im Knorpel selbst ist hierbei jedoch nicht von degradierenden Prozessen auszugehen. Vielmehr scheint es sich um eine basale PG-Freisetzung im physiologischen Knorpelstoffwechsel zu handeln (Voigt et al. 2009, Wann et al. 2010). Bei einer *De novo*-Synthese von PG scheint auch die PG-Freisetzung entsprechend anzusteigen, da nicht alle neu gebildeten PG-Moleküle sofort im Knorpelgerüst fixiert werden können. Insgesamt kann die Freisetzung von PG in den Mediumüberstand im Rahmen von *In vitro*-Kulturen in ihrer Absolutmenge zudem leicht überschätzt werden. Durch die initiale Schaffung von Schnittkanten bei der Präparation der Explantatzylinder entsteht ein methodisch unvermeidbares Artefakt. Durch die lokal gestörte Verankerung innerhalb des Knorpels können randständige PG während der Kultur ins Medium diffundieren. So fiel bei der Interpretation der wöchentlichen Einzeldaten der PG-Freisetzung ins Medium auf, dass sowohl in der unstimulierten als auch in der TGF- $\beta$ 1-Gruppe die höchsten Freisetzungswerte

in den ersten Kulturwochen, also der Zeit mit der höchsten PG-Auswaschrates an den Schnittkanten, zu verzeichnen waren und gegen Kulturende auf ihr Minimum absanken (Abb. 46, Anhang Seite II).

Insgesamt zeigen der gesteigerte PG-Gehalt im kultivierten Knorpel sowie der nur marginale PG-Verlust in den Mediumüberstand, dass die Basis-Kulturbedingungen den PG-Haushalt während der *In vitro*-Kultur auch langfristig nicht negativ beeinflussen. Dies bildet eine geeignete Grundlage für die Untersuchung und Nachahmung des Regenerationsverhaltens akut geschädigten Knorpels.

### Aggrekan

Ogleich bei der Bestimmung des Gesamt-PG-Gehaltes mittels Safranin-O-Färbung bzw. DMB-Assay wahrscheinlich bereits vorwiegend Aggrekan als größtes und häufigstes PG im Gelenkknorpel detektiert wurde, konnten mittels des spezifischen immunhistochemischen Nachweises von neu gebildetem Aggrekan wichtige Erkenntnisse über die lokalen Unterschiede im regenerativen Bestreben der Chondrozyten in Abhängigkeit von der Kulturdauer gewonnen werden. So zeigte sich, dass in der frühen Regenerationsphase nach 2 Wochen nahezu ausschließlich die Chondrozyten in unmittelbarer Defektnähe syntheseaktiv waren und neu gebildete Aggrekanmoleküle im Sinne einer primären Abdichtung in das BNC-Gerüst einlagerten. Ähnliche Befunde *in vivo* haben zur Schöpfung des Begriffes „*cartilage flow*-Phänomen“ geführt (Bruns et al. 1997, Calandruccio und Gilmer 1962). Durch Abrundung der Ränder und „Einfließen“ von Knorpelgewebe in den Defekt wird dabei eine Verkleinerung der Läsionen erreicht, aber keine vollständige Auffüllung. Bislang wurde angenommen, dass der Knorpelfluss dabei rein passiv über den mechanischen Druck, der vom Gelenk auf die Ränder des angrenzenden Knorpels wirkt, vermittelt wird. Die *In vitro*-Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit lassen allerdings darauf schließen, dass Chondrozyten in unmittelbarer Nähe zum Defekt die akute Schädigung auch in Abwesenheit eines externen Druckstimulus durchaus kommunizieren (z.B. über die Bildung zellulärer Mediatoren) und der Knorpel seine Syntheseaktivität gezielt auf diese Bereiche konzentriert, damit die neu synthetisierte Matrix barrierefrei in den Defekt „fließen“ kann.

Zusammen mit dem beobachteten erhöhten Chondrozytenstoffwechsel mit Steigerung der PG-Synthese sowie der gesteigerten Chondrozytenproliferation mit sog. Zellclusterbildung am Defektrand (Abb. 13) kann dieses Phänomen als deutliches Indiz für die gelungene Imitation der intrinsischen Knorpelreparaturmechanismen *in vivo* gewertet werden (Buckwalter und Mankin 1998a, Martinek 2003, Mitchell et al. 1992).

Der Anteil der Aggrekan-positiven Chondrozyten nahm im Laufe der Kulturdauer stetig zu und war nach Ablauf der Gesamtkulturdauer gleichmäßig auf den gesamten Knorpelzylinder ausgeweitet. Interessanterweise war neu synthetisiertes Aggrekan zu jeder Zeit hauptsächlich mit den Chondrozyten assoziiert, während die interterritoriale Matrix insgesamt schwächer gefärbt war. Dieser Befund ist typisch für den in Homöostase befindlichen Knorpel (Handley et al. 2002). Die mit steigender Kulturdauer zunehmende Anfärbbarkeit der interterritorialen Matrixzone hat dabei keinen pathologischen Charakter, sondern beruht vermutlich auf dem physiologisch relevanten Umsatz des Aggrekans. So sind Aggrekanaggregate nach ihrer Bildung zwar vorerst mit den Chondronen assoziiert, werden jedoch nach einer gewissen Zeit von der Chondrozytenoberfläche abgelöst und in die interterritoriale Matrix verlagert (Winter et al. 1998).

Zur quantitativen Analyse der Neusyntheseaktivität von Aggrekan wurde der anabole Knorpelmarker CS846 herangezogen. CS846 detektiert ein spezifisches Epitop aus der Synthesephase von Aggrekan und wird vor der Formation des großen reifen Proteins abgespalten. Es agiert als Indikator für eine ausgeprägte Aggrekan-Neosynthese und kommt hauptsächlich im intakten fetalen Knorpel vor. Sein Gehalt sinkt mit voranschreitender Knorpelentwicklung deutlich (Glant et al. 1986) und ist nur im Rahmen von Reparaturprozessen auch im adulten Knorpel in höheren Konzentrationen nachweisbar (Rizkalla et al. 1992). In der Literatur wurde die Konzentration von CS846 bisher hauptsächlich in Synovialflüssigkeit (Lohmander et al. 1999, Poole et al. 1994) und Serum bestimmt (Hunter et al. 2007, Matyas et al. 2004), jedoch kaum im Knorpel selbst, und stellt hier einen eindeutigen Biomarker für die Aggrekansyntheserate im Rahmen entzündlicher oder degenerativer Gelenkerkrankungen dar.

Als Referenzwert für frischen, unkultivierten bovinen Knorpel wurde eine CS846-Konzentration von  $131,0 \pm 28,9 \mu\text{g/g FG}$  ermittelt. Aufgrund weniger vergleichbarer Daten lässt sich dieser Wert relativ schwierig in den wissenschaftlichen Kontext einordnen. Rizkalla und Mitarbeiter beschrieben im adulten humanen Normalknorpel eine basale CS846-Konzentration von  $52 \pm 27 \mu\text{g/g FG}$  (Rizkalla et al. 1992), was zumindest die Plausibilität der eigenen Konzentrationsdimensionen unterstreicht. Aufgrund zahlreicher Unterschiede hinsichtlich Knorpelspezies (human vs. bovin), -alter (71 vs. 2-3 Jahre), Extraktionsprotokoll und Nachweismethode (ELISA vs. Radioimmunoassay) erscheinen die zahlenmäßigen Differenzen zweifellos erklärbar.

Bereits nach 2 Wochen *In vitro*-Kultur hatte sich die Konzentration an CS846 als Zeichen einer exzessiven Aggrekan-Neosynthese sowohl in der unstimulierten als auch in der

TGF- $\beta$ 1-Gruppe ungefähr verdoppelt. Dieses erhöhte Niveau von etwa 260  $\mu\text{g/g}$  FG wurde über den gesamten weiteren Kulturverlauf in beiden Versuchsgruppen nahezu konstant aufrecht erhalten. Interessant war dabei die Entwicklung der simultanen CS846-Freisetzung in den Mediumüberstand. Die Einzelmessungen der wöchentlich freigesetzten Mengen ergaben dabei für CS846 als einzigen Parameter einen insgesamt zunehmenden Trend (Abb. 46, Anhang Seite II), was für eine exzessive Neosynthese und gegen eine initiale Auswaschung von CS846-Molekülen an den Schnittkanten spricht, wie sie für die residenten Knorpelmarker (PG, COMP, Kol2) angenommen wird. Am Ende der Langzeitkultur wurde wöchentlich ebenso viel CS846 ins Medium abgegeben wie es im Knorpel selbst enthalten war, so dass davon ausgegangen wird, dass die Chondrozyten Aggrekan in einem massiven Überschuss produzierten, um den substantiellen Defekt ausgleichen zu können. Diese Daten sind konkludent zur immunhistochemisch beobachteten Ablagerung von Aggrekan im randständigen BNC-Gerüst.

Abschließend gelang es, in der Aggrekan-Analyse unter Anwendung der „*real time*“-RT-PCR auch differenzierte Aussagen über die Syntheseaktivität einzelner Zellpopulationen auf molekularbiologischer Ebene an den verschiedenen Orten der Regeneration zu treffen. Damit konnten die bislang gewonnenen Daten aus der Proteinanalyse, die sich allein mit den Vorgängen innerhalb der Knorpelmatrix beschäftigten, um entscheidende Aspekte bezüglich der Expressionsaktivität migrierter Chondrozyten erweitert werden. Der Vorteil dieser Methode besteht in der Möglichkeit, den Verlauf der PCR in Echtzeit zu verfolgen und die amplifizierten Genfragmente zuverlässig und exakt zu quantifizieren. Die Expression von Aggrekan war im nativen Knorpel deutlich nachzuweisen und zeigte im Kulturverlauf im Vergleich zwischen knorpelständigen und migrierten Chondrozyten auf der Knorpelaußenseite und BNC unterschiedliche Expressionsprofile. Für die Chondrozyten innerhalb der kultivierten Knorpelmatrix zeigte sich, konkludent zu den Daten aus der Proteinanalyse, eine deutliche Induktion der Aggrekan-mRNA-Synthese um den Faktor 2 (unstimuliert) bzw. 1,5 (TGF- $\beta$ 1), die zumindest in der unstimulierten Gruppe auch nach 8 Wochen noch klar über dem Expressionsniveau des frischen Knorpels lag. Migrierte Zellen auf der Knorpelaußenseite bzw. auf der BNC hingegen wiesen nach 2 Wochen eine stark reprimierte Aggrekan-Expression auf, die sich jedoch in beiden Zellpopulationen im Laufe der Kulturdauer zu erholen schien und einen kontinuierlich positiven Trend in Richtung Ausgangsniveau zeigte. Das zur Mobilisierung notwendige Herauslösen der Chondrozyten aus ihrer natürlichen Umgebung kann prinzipiell mit der Situation einer Chondrozytenisolation verglichen werden. Schon seit einiger Zeit ist bekannt, dass

Chondrozyten in Monolayerkulturen zur schnellen Dedifferenzierung neigen und einen fibroblastenartigen Phänotyp annehmen, während sie gleichzeitig die Produktion chondrozytärer Markerproteine wie Kol2 und Aggrekan reduzieren (Darling und Athanasiou 2005, Kaps et al. 2004, Schnabel et al. 2002, Velikonja et al. 2001).

Gleichzeitig wird auch über die Redifferenzierungsfähigkeit isolierter Chondrozyten unter Änderung des Kulturmodells berichtet. V.a. die Zelldichte sowie Zell-Matrix-Interaktionen spielen eine kritische Rolle für die Stabilisierung des chondrozytären Phänotyps. Primär dedifferenzierte Chondrozyten konnten so in Hochdichte- bzw. Pelletkulturen (Malda et al. 2003, Tallheden et al. 2004) wie auch durch Aussaat in dreidimensionalen Matrices (Anders et al. 2009, Kaps et al. 2004, Miot et al. 2005) zu ihrem ursprünglichen Expressionsprofil knorpelspezifischer Markermoleküle zurückgeführt werden. Die EZM hat also diverse regulatorische Effekte auf die Prägung der Differenzierungsrichtung, die Proliferation, die Funktion und die Erhaltung des Chondrozytenphänotyps. Dabei werden möglicherweise  $\beta$ 1-Integrin-vermittelt intrazelluläre Signalübertragungswege aktiviert. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass durch die  $\beta$ 1-Integrin-vermittelte Adhäsion der Chondrozyten an extrazellulären Matrix-Komponenten wie Kol2 der Ras-MAP-Kinase-Signalübertragungsweg, ein zentraler Signalweg in den Chondrozyten, stimuliert und dadurch vermutlich eine Dedifferenzierung der Chondrozyten verhindert wird (Shakibaei et al. 2008, Shakibaei und Merker 1999).

Die initiale Repression der Aggrekan-mRNA-Synthese der migrierten Chondrozyten lässt sich also durchaus mit dem Verlust ihres unmittelbaren Kontaktes mit der Knorpelmatrix begründen. Ebenso kann die mit steigender Kulturdauer zunehmende Anzahl mobilisierter Zellen auf Knorpeloberfläche und BNC sowie deren feste Adhäsion auf dem Implantatuntergrund die Ursache für den Redifferenzierungstrend in der Aggrekan-mRNA-Expression darstellen.

### 6.1.5 COMP

COMP spielt aufgrund seiner Interaktion mit den Kollagenen Typ I, II und IX eine wichtige Rolle bei der Fibrillogenese im Knorpel. Bei seiner immunhistochemischen Darstellung fiel sowohl in der unstimulierten als auch in der TGF- $\beta$ 1-Gruppe nach 2 Wochen ein gegenüber dem Frischknorpel initial verminderter COMP-Gehalt auf, der sich jedoch im Verlauf der Langzeitkultur lichtmikroskopisch wieder annähernd an das Färbeargebnis der Referenzproben anglich und demnach als Ausdruck einer vermehrten COMP-Neosynthese im



Sinne eines Regenerationsbestrebens von Seiten der Chondrozyten zu bewerten ist. Insgesamt gestaltete sich die immunhistochemische Anfärbung von COMP in der Knorpelmatrix jedoch relativ schwierig. Das Farbsignal im Knorpel war in allen Proben im Gegensatz zur BNC nur sehr schwach ausgeprägt, so dass auch die beobachteten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nicht als eindeutig einzustufen sind. Dieser Aspekt darf allerdings nicht als niedriger COMP-Gehalt in der Matrix fehlinterpretiert werden, sondern scheint ein bereits mehrfach beobachtetes methodisches Problem zu sein. Mehrere Autoren beschrieben die unzureichende bis gänzlich fehlende Anfärbbarkeit von COMP in Normalknorpel-explantaten, wobei erst degenerative Veränderungen *in vivo* (Delot et al. 1998, Wagner et al. 2003) bzw. *in vitro* (Pretzel et al. 2009) zu einer vermehrten Darstellbarkeit führten. Neben der erwähnten vermehrten Neosynthese als Zeichen regenerativer Prozesse wird hierbei v.a. eine verbesserte Zugänglichkeit des AK zum COMP-Epitop verantwortlich gemacht, welche aus einer zunehmenden Demaskierung von COMP als Zeichen eines fortschreitenden PG-Verlustes im Rahmen von Degradationsprozessen resultiert. Die anhaltend eingeschränkte Anfärbbarkeit von COMP in den vorliegenden Daten kann also als Beleg für den nachgewiesenen, anhaltend hohen PG-Gehalt im Knorpel gewertet werden.

Bei der Analyse der Mediumüberstände zeigte sich in beiden Versuchsgruppen v.a. initial eine große Menge an freigesetztem COMP, die im weiteren Verlauf von Woche zu Woche abnahm (Abb. 46, Anhang Seite II) und zu einer Abflachung der kumulativen Freisetzungskurven führte. Die beachtlich hohe COMP-Freisetzung in den ersten beiden Kulturwochen beruht wahrscheinlich auf der relativ lockeren Bindung der COMP-Moleküle an die umgebende Knorpelmatrix (Dickinson et al. 2003), wodurch deren Auswaschung v.a. an den präparationsbedingten Schnittkanten der Knorpelzylinder entscheidend verstärkt wurde, was auch das verminderte immunhistochemische Farbsignal nach 2 Wochen erklärt.

Die quantitative Untersuchung von COMP im Knorpel gelang mittels der dargestellten Versuchsmethoden leider nicht, so dass auch eine Einordnung des Ausmaßes des freigesetzten zum tatsächlich im Knorpel enthaltenen COMP an dieser Stelle nicht möglich ist. Da hierfür der gleiche hCOMP-ELISA-Kit verwendet wurde, wie für die Analyse der Mediumüberstände, in denen bovines COMP problemlos detektiert werden konnte, ist eine fehlende Interspezies-Kreuzreaktivität des Systems als Ursache für die fehlende Nachweisbarkeit von COMP im Knorpel auszuschließen. Diese muss vielmehr in der vorherigen Behandlung der Knorpelproben zur Proteinextraktion gesucht werden. Auffällig ist dabei, dass weder in den Extrakten der Lysate noch der Knorpelpulver COMP zu detektieren war, obwohl die Extraktionsmethoden zur COMP-Extraktion mit einigen

Modifikationen bereits etabliert waren (Hedbom et al. 1992, Smith et al. 1997). Die Extraktion mit GuHCl unter Zusatz von Mercaptoethanol führt allerdings zu einer Denaturierung des COMP-Moleküls, wobei der verwendete AK im ELISA hingegen vermutlich nur intaktes, nicht denaturiertes COMP detektiert. Der COMP-Nachweis in den erwähnten Literaturstellen gelang im Gegensatz dazu mittels Elektrophorese und Western Blot unter Verwendung anderer AK.

### 6.1.6 Kollagene

#### Kollagen Typ II

Der Gehalt von Kol2, dem mengenmäßig häufigsten Knorpelkollagen, wurde sowohl immunhistochemisch als auch auf Protein- und mRNA-Ebene untersucht. In der immunhistochemischen Darstellung von Kol2 wurde qualitativ kein gravierender Unterschied in der Farbtintensität zwischen unstimuliertem und TGF- $\beta$ 1-stimuliertem Knorpel detektiert. In beiden Versuchsgruppen konnte der Matrixgehalt von Kol2 im Kulturverlauf zufriedenstellend aufrecht erhalten werden. Nach 4 bzw. 8 Wochen zeigten sich v.a. im unstimulierten Knorpel lediglich lokal verminderte Färbeergebnisse an den Schnittkanten und Oberflächen der Knorpelzylinder, wo Kol2 aufgrund seiner lokal gestörten Verankerung innerhalb des Knorpels zunehmend ins Medium zu diffundieren schien.

Die in der quantitativen Proteinanalyse ermittelten, initialen Kol2-Dimensionen im Bereich von 1 bis 2 mg/g FG erscheinen anhand vergleichbarer Daten bezüglich des Kol2-Gehaltes im gesunden, bovinen Gelenkknorpel um 30 mg/g FG (Williamson et al. 2003) bzw. 58 mg/g FG (Waters 2007) nicht glaubwürdig, so dass nach methodischen Fehlerquellen gesucht werden muss. Da der entsprechende Kol2-ELISA erst etabliert, zuletzt durchgeführt und die Proben entsprechend lange gelagert werden mussten (bis zu sechs Monaten), ist dementsprechend eine zwischenzeitliche Teildegradation von initial enthaltenem Kol2 trotz der Lager-temperatur von -20°C nicht ganz auszuschließen. Eine weitere Fehlerquelle kann im notwendigen Aufschluss der polymeren Kollagen-Moleküle in monomeres Kollagen mittels Pepsin und Pankreas-Elastase liegen. Beide enzymatischen Verdaue erfordern das genaue Einstellen von definierten pH-Werten und reagieren dementsprechend sensitiv. Ein nur partieller Abbau von intra- und intermolekularen Crosslinks innerhalb von polymeren Kollagen-Molekülen aufgrund nicht ausreichender Enzymaktivität kann so zu einer verminderten Kol2-Detektion im nachgeschalteten ELISA geführt haben. Die schließlich ermittelten Werte der Kol2-Konzentration in Knorpel und Mediumüberstand können aufgrund

der einheitlichen Behandlung also lediglich untereinander verglichen werden, eine Größeneinordnung in die entsprechende Literatur ist an dieser Stelle noch nicht möglich. Für die unstimulierten Proben wurde ein gegenüber dem frischen Knorpel numerisch gering verminderter Gehalt von Kol2 in der Matrix über den gesamten Kulturverlauf nachgewiesen, der jedoch im Rahmen der methodischen Probleme vernachlässigbar erscheint und mit den Ergebnissen aus der Immunhistochemie übereinstimmt. Der TGF- $\beta$ 1-stimulierte Knorpel wies im Gegensatz dazu interessanterweise einen über die Kulturzeit hinweg zunehmenden Trend in seinem Kol2-Gehalt auf, der sich ebenfalls mit den immunhistochemischen Ergebnissen vereinbaren lässt. Hier zeigte sich v.a. nach 8 Wochen zwar eine randständig verminderte Anfärbbarkeit der Matrix für Kol2. Die zentralen Knorpelbezirke wiesen jedoch eine stärkere Farbintensität als der unstimulierte bzw. frische Knorpel auf, was insgesamt für eine Kol2-Mehrsynthese der Proben unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ 1 spricht.

Verglichen mit den Daten aus der „*real time*“-RT-PCR ist Kol2 der einzige Marker für den eine Diskrepanz zwischen Protein- und mRNA-Bestimmung auffällig war. Auf Transkriptionsebene zeigte sich im Vergleich zum frischen Knorpel in allen kultivierten Proben eine numerische Induktion der Kol2-mRNA-Synthese in den knorpelständigen Chondrozyten, die außerdem in den unstimulierten Proben stärker ausgeprägt war als in der TGF- $\beta$ 1-Gruppe. An dieser Stelle liegt der Verdacht nahe, dass die knorpelständigen Chondrozyten abhängig vom eingesetzten TGF- $\beta$ 1-Stimulus die in beiden Fällen gesteigerte Kol2-mRNA-Expression auf Translationsebene unterschiedlich übersetzen. Unstimulierter Knorpel scheint seinen während der Kultur erhöhten Gehalt an Kol2-mRNA nicht in vollem Maße zu translatieren, was in dem zu allen Kulturzeitpunkten gegenüber frischem Knorpel leicht verminderten Kol2-Proteingehalt resultiert.

Die zusätzliche Stimulation des Knorpels mit TGF- $\beta$ 1 führte neben einer Steigerung der Kol2-Synthese auf Transkriptionsebene auch zu einer überschießenden Translation der Kol2-mRNA und damit zu einem numerisch erhöhten Kol2-Proteingehalt gegenüber frischem und unstimuliertem Knorpel. Ein genereller Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Translation der Kol2-mRNA unter den hier vorliegenden experimentellen Bedingungen wurde in der Literatur zwar noch nicht beschrieben. Allerdings bewirkte TGF- $\beta$ 1 in verschiedenen Studien an Primärkulturen isolierter Kaninchenchondrozyten eine signifikante Steigerung der Kol2-Proteinsynthese im Einklang mit erhöhten mRNA-Levels, während bezüglich Kol1 trotz substantiell nachgewiesener Kol1-mRNA eher translationsinhibierende Effekte von TGF- $\beta$ 1 beobachtet wurden (Galera et al. 1992a, Galera et al. 1992b), so dass eine TGF- $\beta$ 1-abhängige Beeinflussung der Kollagen-Translation prinzipiell nicht abwegig erscheint. Da eine

vermehrte mRNA-Synthese in beiden Versuchsgruppen beobachtet wurde, ist diese nicht zwingend TGF- $\beta$ 1-abhängig, sondern vielmehr ein globales anaboles Reparaturbestreben der knorpelständigen Chondrozyten als Reaktion auf die initiale Defektsetzung. Da die Kol2-mRNA-Synthese in den TGF- $\beta$ 1-stimulierten Chondrozyten zumindest nach 2 und 4 Wochen sogar weniger stark induziert wurde als in der unstimulierten Gruppe, ist bei der eingesetzten Dosis von 10 ng/ml eventuell sogar von einer langfristigen TGF- $\beta$ 1-Überstimulation auszugehen (siehe 6.2.2).

Hinsichtlich der Kol2-mRNA-Expression in den migrierten Chondrozyten zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bereits für Aggrekan. Auch hier wurde nach Emigration der Chondrozyten aus der sie umgebenden EZM nach 2 Wochen eine initiale Repression im Sinne einer Dedifferenzierung mit anschließender Erholung beobachtet. Auch für Kol2 sei dabei auf den scheinbar redifferenzierenden Einfluss des Implantatmaterials auf den chondrozytären Phänotyp hingewiesen. Die Hintergründe dieses zwischenzeitlichen phänotypischen Wechsels der Chondrozyten hinsichtlich der Expression von knorpelspezifischen Markermolekülen nach Emigration aus der Matrix wurden unter 6.1.4 bereits ausführlich diskutiert.

Zur detaillierten quantitativen Untersuchung der anabolen und katabolen Prozesse im Knorpelkollagen-Stoffwechsel als Reaktion auf die Modellbedingungen in Langzeitkultur wurden etablierte Kollagenauf- und -abbaumarker herangezogen.

Kol2 wird von den Chondrozyten als Pro-Kollagen synthetisiert. Die darin enthaltenen Amino- und Carboxy-Propeptide werden anschließend extrazellulär proteolytisch abgespalten, bevor die reifen Kollagenmoleküle zu Fibrillen formiert werden. Das dabei frei werdende Kol2-C-Propeptid (CPII) kann mithilfe eines spezifischen AK detektiert werden und korreliert als Aufbaumarker direkt mit der Menge von neu synthetisiertem Kol2 (Nelson et al. 1998). Die Analysen bezüglich des CPII-Gehaltes in Knorpel und Mediumüberstand im Verlauf der Langzeitkultur ergaben für beide Versuchsgruppen eindeutige Hinweise auf ein anaboles Bestreben der Chondrozyten hinsichtlich der Neosynthese von Kol2, das unter zusätzlicher Stimulation des Knorpels mit TGF- $\beta$ 1 noch etwas ausgeprägter erschien. Die Konzentration von CPII im frischen Knorpel konnte über die gesamte Kulturdauer mindestens aufrechterhalten, z.T. auch deutlich gesteigert werden. Die im Vergleich zum Knorpelgehalt eher vernachlässigbaren Mengen von CPII, die ins Kulturmedium freigesetzt wurden, sprechen wiederum dafür, dass neu synthetisiertes Kol2 gut in der EZM stabilisiert werden konnte und im langfristigen Kulturverlauf zunehmend weniger über Diffusionsprozesse an den Defektkanten verloren ging (Einzeldaten siehe Abb. 46, Anhang Seite II). Konkludente

Daten mit relativ ähnlichen Kurvenverläufen hatten sich bereits bei der Analyse von freigesetztem Kol2 ergeben. Erhöhte CPII-Mengen infolge einer gesteigerten Kol2-Neosynthese wurden *in vivo* bereits in osteoarthrotisch verändertem Knorpel beschrieben (Aurich et al. 2005, Squires et al. 2003), was an dieser Stelle als Kompensationsversuch der Chondrozyten auf die gleichzeitig stattfindende exzessive Matrixkollagen-Degradation im Rahmen der knorpeldestruierenden Prozesse interpretiert wurde.

Daher wurde zur Beurteilung der Kollagendegradation im eigenen Kulturverlauf der Gehalt an C12C-Peptid im kultivierten Knorpel sowie im Mediumüberstand analysiert. Es ist bereits bekannt, dass der Kollagenabbau erst zu einem späteren Zeitpunkt der Knorpeldestruktion nach fundamentaler Schädigung der Matrix-PG einsetzt (Kozaci et al. 1997), wobei das intakte Kol2-Molekül durch verschiedene MMP in ein  $\frac{3}{4}$ - und ein  $\frac{1}{4}$ -Bruchstück gespalten wird (Wu et al. 2002). Das dabei entstehende C12C-Neoepitop kann dann durch spezifische AK detektiert werden und agiert als Destruktionsmarker für gespaltenes Kol2 und weniger für Kol1. Im frischen unkultivierten Knorpel wurde das C12C-Peptid als Zeichen des physiologischen Matrixumsatzes nur in geringen Mengen nachgewiesen und machte im Vergleich zum Gesamt-Kol2-Gehalt nur etwa 0,8% aus, womit es mengenmäßig in vergleichbaren Dimensionen anzusiedeln war, wie sie für gesunden humanen Knorpel bereits beschrieben wurden (Aurich et al. 2005). Unabhängig von der Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 zeigte sich im Kulturverlauf in allen Versuchsgruppen eine konstante Reduktion des C12C-Gehaltes. Im Mediumüberstand lag die Konzentration an C12C-Neoepitop über die gesamte Kulturdauer hinweg unterhalb der Nachweisgrenze. Dagegen wurde in vergleichbaren *In vitro*-Explantat-Kulturen durch die gezielte Induktion knorpeldestruierender Prozesse [z.B. durch IL-1- oder *Tumornekrose-Faktor (TNF)  $\alpha$* -Stimulation] mit initialem PG-Verlust ein massiver Kollagenabbau im Sinne steigender C12C-Konzentrationen im bovinen Knorpel beobachtet (Pretzel et al. 2009). Ebenso zeigte sich neben einem deutlichen PG-Verlust sekundär eine signifikante *In vivo*-Erhöhung des Neoepitops in den frühen und fortgeschrittenen Phasen des osteoarthrotisch geschädigten humanen Gelenkknorpels (Aurich et al. 2005, Billingham et al. 1997, Squires et al. 2003). Der in dieser Arbeit nachgewiesene schützende PG-Gehalt im kultivierten Knorpel und der fehlende Nachweis eines substantiellen PG-Verlustes über den gesamten Kulturzeitraum unterstreichen jedoch die protektive Wirkung eines hohen Aggrekan-Gehaltes in der EZM vor dem proteolytischen Angriff von residenten MMP auf die Kollagene (Pratta et al. 2003). Dabei scheint die Aufrechterhaltung eines stabilen PG-Metabolismus in der Langzeitkultur zur langfristigen Wahrung der globalen Knorpelintegrität von hoher Wichtigkeit zu sein. Die molekulare

Erklärung hierfür ist wahrscheinlich in der Interaktion zwischen den Kollagenfasern und den überlagernden CS-haltigen Aggrekan-Regionen zu suchen, die den Zugang von MMP wirkungsvoll verhindern sollen (Pratta et al. 2003).

Die dargelegten Befunde für Kol2 repräsentieren eindrucksvoll die Verlagerung des Stoffwechselgleichgewichtes im Defektmodell zugunsten anaboler Prozesse im Sinne einer echten endogenen Knorpelregeneration. Diese sollte von der im Rahmen degenerativer Gelenkveränderungen beobachteten, zwischenzeitlichen Steigerung der Matrixsynthese als Reaktion auf fortschreitende Knorpeldestruktion unterschieden werden. In dem letzten Fall wird eine fehlende Korrelation zwischen gesteigerter Synthese und Degradation von Kol2 postuliert, die einen unkoordinierten Matrixumsatz des pathologisch veränderten Knorpels anzeigt (Squires et al. 2003). Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete isolierte Steigerung anaboler (gesteigerter CII-Gehalt) unter Reduktion kataboler Prozesse (verminderter C12C-Gehalt) spricht dagegen eher für gezielte Regenerationsversuche im Defektmodell, um die substantielle Schädigung mit einer Netto-Mehrsynthese von EZM auszugleichen. Diese Befunde legen ein gewisses Selbstheilungspotential des Knorpels nahe, das aber für eine wirksame Knorpelheilung *in vivo* nicht auszureichen scheint.

### Kollagen Typ I

Koll hat sich in der Knorpelforschung zu einem etablierten chondrozytären Dedifferenzierungsmarker entwickelt und wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet, um den Einfluss des Kulturmodells auf die phänotypische Stabilität der Chondrozyten zu untersuchen. Immunhistochemisch konnte Koll in frischem, unkultiviertem Knorpel erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden (LaPrade et al. 2008). Auch im weiteren Verlauf der Langzeitkultur zeigte sich unabhängig von der Versuchsgruppe der Matrixgehalt von Koll im Knorpel auf einem qualitativ nicht nachweisbaren Niveau, was die stabilisierenden Kulturbedingungen im System erneut belegt. Die Beibehaltung des chondrozytären Phänotyps konnte mittels „*real time*“-RT-PCR bis auf die Ebene der Koll-mRNA-Expression zurückverfolgt werden, die sich für die knorpelständigen Chondrozyten im gesamten Kulturverlauf ebenfalls auf einem nahezu vernachlässigbaren Level bewegte. Anders gestaltete sich die mRNA-Analyse der emigrierten Chondrozyten: Auf die Knorpeloberfläche ausgewanderte Zellen exprimierten v.a. in der unstimulierten Versuchsgruppe vergleichsweise hohe Mengen an Koll mit einem Maximum bei 4 Wochen. Nach Herauslösen der Zellen aus ihrer umgebenden Matrix zeigt sich also auch für diesen Parameter der vorübergehende Verlust des chondrozytären Phänotyps auf molekularer Ebene,

der neben der Repression des knorpelspezifischen Typ-II- von der Induktion des eher fibroblastoiden Typ-I-Kollagens begleitet wird (Benya und Shaffer 1982, Schnabel et al. 2002). Nach Erreichen der Matrix-imitierenden BNC schien sich der chondrozytäre Phänotyp interessanterweise schnell wieder auszubilden. Die Kol1-mRNA-Expression der auf die BNC migrierten Chondrozyten zeigte über den gesamten Kulturverlauf wieder deutlich reprimierte Werte, die nur wenig über dem Niveau der knorpelständigen Zellen angesiedelt waren. Damit ist Kol1 derjenige Marker, der die differenzierende und stabilisierende Wirkung von BNC als Matrixscaffold am schnellsten (bereits nach 2 Wochen) und deutlichsten belegt. Während die Expression knorpelspezifischer Gene wie Aggrecan und Kol2 erst nach Adhäsion auf der BNC-Oberfläche langsam wieder gesteigert wird (notwendige Zeiträume deutlich über 8 Wochen), scheint die Kol1-Synthese sofort nach Erreichen der Cellulosematrix wieder reprimiert zu werden.

Die vorübergehende Dedifferenzierung der migrierenden Chondrozyten in einen fibroblastoiden Zelltyp könnte für die Applikation des zellfreien Implantates mit notwendiger Zellrekrutierung sogar einen Vorteil darstellen. Wie oben beschrieben ist das klassische Modell der aktiven Zellmigration nämlich immer mit der Polarisierung des Zellkörpers in Richtung des Stimulus und der Ausbildung gerichteter kontraktile Zellausläufer (Pseudopodien) assoziiert (Morales 2007), die möglicherweise von den fibroblastoiden Zellen leichter umgesetzt werden kann. Die dementsprechende Morphologie konnte in den REM-Aufnahmen ausgewanderter Chondrozyten bestätigt werden.

## 6.2 Relative Bedeutung von TGF- $\beta$ 1 im *In vitro*-Regenerationsmodell

Der Einsatz bioaktiver Faktoren hat sich auf dem Gebiet der regenerativen Knorpelforschung zu einem attraktiven Instrument für die gezielte Stimulation von Zellproliferation, -differenzierung und Matrixsynthese entwickelt. Hinsichtlich der Produktentwicklung eines Knorpelersatzimplantates aus BNC ist daher langfristig die reversible Bindung eines geeigneten Wachstumsfaktors an das Gerüstmaterials geplant, der nach kontrollierter Freisetzung die endogene Knorpelregeneration entscheidend beschleunigen soll. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher das Potential des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 hinsichtlich der drei essentiellen Säulen *In vitro*-Matrixsynthese, -Zellproliferation und -rekrutierung evaluiert und Rückschlüsse auf seine Eignung als geeigneter bioaktiver Modellfaktor gezogen werden.

Bezüglich der zusätzlichen Stimulation der kultivierten Knorpel-BNC-Konstrukte mit TGF- $\beta$ 1 im Regenerationsmodell wurden parameterspezifisch unterschiedliche, mehr oder minder ausgeprägte Effekte des Wachstumsfaktors beobachtet. Dieser Sachverhalt impliziert grundsätzlich die Vitalität der kultivierten Zellen, die differentiell auf den angebotenen Stimulus reagierten.

### 6.2.1 Knorpelintegrität

In den frühen Kulturstadien wurde ein chondroprotektiver Effekt von TGF- $\beta$ 1 bezüglich der beschriebenen Oberflächenerosion und superfiziellen Matrixdegradation detektiert. Die semiquantitative Analyse ergab in allen Kulturphasen einen numerisch niedrigeren Erosionsgrad in den TGF- $\beta$ 1-stimulierten Proben als im unstimulierten Knorpel sowie eine deutlich kleinere Anzahl von mobilisierten Chondrozyten. Diese beiden Befunde wiesen eine hochsignifikante Korrelation auf. Als strukturelle Ursache hierfür konnte mittels REM-Untersuchungen eine progrediente oberflächliche Ablösung der *Lamina splendens* im Verlauf der Langzeitkultur ohne TGF- $\beta$ 1 identifiziert werden. Die oberflächliche Integrität von *in vitro* kultiviertem Knorpel scheint unter Stimulation mit dem Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 dagegen länger aufrecht erhalten zu werden. Dazu könnte als entscheidender Faktor der induktive Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die mRNA-Expression und Proteinsynthese von Lubricin beitragen (Jones und Flannery 2007, Khalafi et al. 2007, Schmidt et al. 2008), das einen Hauptbestandteil der zellfreien *Lamina splendens* darstellt.

Die erhobenen Befunde sprechen außerdem für den in der Literatur beschriebenen modulierenden Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die Expression matrixdegradierender Enzyme im Knorpel. Dabei soll TGF- $\beta$ 1 einerseits die Expression bestimmter MMP-Gene direkt hemmen (Hui et al. 2001), andererseits aber auch die Synthese endogener Inhibitoren wie *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP) stimulieren und damit die Aktivität der MMP indirekt neutralisieren (Qureshi et al. 2005, Su et al. 1998), was ebenfalls zum protektiven Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf den Knorpel beitragen könnte.

### 6.2.2 Matrixsynthese

Bezüglich der Matrixsynthese konnten nach Auswertung aller histologischen und biochemischen Untersuchungen nur geringe, molekülspezifische Effekte einer zusätzlichen TGF- $\beta$ 1-Stimulation im Regenerationsmodell beobachtet werden. Diese zeigten sich v.a. in der Analyse der Knorpelkollagene. Eine sichtbare Wirkung des Wachstumsfaktors wurde



auch hier v.a. hinsichtlich Chondroprotektion und Stabilisierung des chondrozytären Phänotyps beobachtet. TGF- $\beta$ 1 bewirkte in den knorpelständigen und noch deutlicher in den migrierten Chondrozyten über den gesamten Kulturverlauf eine starke Repression des Dedifferenzierungsmarkers Kol1. Von einer ähnlich stabilisierenden Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf humane Chondrozyten in Pelletkulturen wurde in der Literatur bereits berichtet (Goldberg et al. 2005), in denen die Synthese von knorpeluntypischem Kol1 durch die Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 ebenfalls erfolgreich unterdrückt wurde.

Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit im TGF- $\beta$ 1-stimulierten Knorpel über den gesamten Kulturverlauf ein gesteigerter Netto-Gehalt von Kol2-mRNA (gegenüber frischem Knorpel) und -Protein (gegenüber frischem und unstimuliert kultiviertem Knorpel) beobachtet. Aufgrund fehlender Literaturdaten bezüglich der TGF- $\beta$ 1-vermittelten Effekte auf die Kol2-Synthese in Knorpel-Explantat-Kulturen war die Einordnung der eigenen Daten jedoch schwierig. Zudem existiert selbst für die häufig untersuchte TGF- $\beta$ 1-vermittelte Wirkung auf die Kol2-Synthese in isolierten Gelenkchondrozyten keine eindeutige Literaturmeinung, da in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Zellen sowohl von stimulierenden (Redini et al. 1988) als auch von inhibitorischen TGF- $\beta$ 1-Effekten auf kultivierte Primärchondrozyten berichtet wird (Galera et al. 1992a).

Hinsichtlich der für isolierte Chondrozyten bzw. Knorpelgewebeskulturen gut belegten und eigentlich erwarteten Steigerung der knorpelspezifischen PG-Synthese durch TGF- $\beta$ 1 (Morales und Roberts 1988, Redini et al. 1988, van Osch et al. 1998b) zeigte sich in dieser Arbeit kein eindeutiger Effekt der TGF- $\beta$ 1-Stimulation. So ergab die quantitative Bestimmung des Aggrekan-Aufbaumarkers CS846 im kultivierten Knorpel für die unstimulierten und TGF- $\beta$ 1-stimulierten Proben über den gesamten Verlauf etwa vergleichbare Daten. In der Analyse des Gesamt-PG-Gehaltes und der Aggrekan-mRNA-Expression im Knorpel zeigte TGF- $\beta$ 1 sogar eine eher reprimierende Wirkung.

Mögliche Ursachen für die insgesamt sehr geringen Unterschiede zwischen unstimuliertem und TGF- $\beta$ 1-stimuliertem Knorpel sind in der Wahl der Versuchsbedingungen für die langfristige Gewebekultur im vorgestellten Modell zu suchen. Untersuchungen zur isolierten Wirkung eines Wachstumsfaktors auf Zellen oder Gewebe werden im Allgemeinen unter serumfreien Bedingungen bzw. unter minimalster Basalstimulation mit FCS durchgeführt (Mandl et al. 2002, Morales et al. 1991, Morales und Roberts 1988, Sah et al. 1996). Auf diese Weise können im Serum enthaltene Stimulantien eliminiert werden, die die Effekte des supplementierten Wachstumsfaktors eventuell verändern oder maskieren bzw. die Beurteilung der Einzelfaktorwirkung verhindern. Den großen Nachteil dieser definierten Analysemethode

stellt die zeitliche Begrenzung auf eine relativ kurze Kulturdauer dar. In vergleichbaren Studien, die sich mit der Kultur von Knorpelgewebe unter serumarmer TGF- $\beta$ 1-Stimulation beschäftigten, wurden Kulturzeiträume von max. 21 Tagen erreicht. Das Maximum eines TGF- $\beta$ 1-vermittelten Benefits bezüglich der PG-Synthese bzw. des GAG-Gehaltes wurde dabei jedoch in den ersten sechs Kulturtagen erreicht. Nach Ablauf des besagten Zeitraums war bereits kein signifikanter Effekt des Wachstumsfaktors mehr zu verzeichnen und die gemessenen Werte lagen z.T. bereits unterhalb von denen des Ausgangsniveaus bzw. der serumreichen Referenzproben (Morales und Roberts 1988). Isolierte TGF- $\beta$ 1-vermittelte Effekte scheinen unter serumarmen Bedingungen also nur kurzfristig nachweisbar zu sein, während die langfristig stabile *In vitro*-Kultur von Knorpelgewebe entscheidend von einem ausreichend hohen Serumanteil im Basalmedium abhängt. Aus diesem Grund konnte im vorliegenden Regenerationsmodell bei TGF- $\beta$ 1-Stimulation nicht auf das Basismedium mit 5% FCS + ITS verzichtet werden, dessen Komponenten die Effekte des Wachstumsfaktors vermutlich maskierten bzw. neutralisierten. Die direkte Beeinflussung der TGF- $\beta$ 1-Wirkung durch im Medium enthaltenes Serum wurde auch für equine Chondrozyten bereits beschrieben, die in einer soliden dreidimensionalen Fibrinmatrix kultiviert wurden. In dieser Studie bewirkte die Zugabe von exogenem TGF- $\beta$ 1 zu serumfreiem Kulturmedium eine gesteigerte PG-Synthese mit Akkumulation der Gesamt-PG, während die Stimulation mit dem Wachstumsfaktor in FCS-supplementiertem Medium sogar zu einer Verringerung der PG-Synthese führte (Fortier et al. 1997).

Anhand des durchflusszytometrischen Nachweises des TGF- $\beta$ RII auf der Chondrozytenoberfläche wurde eine prinzipielle Reaktionsfähigkeit auf TGF- $\beta$ 1 zu Beginn der *In vitro*-Kultur belegt. Etwa ein Drittel der bovinen Chondrozyten zeigte dabei eine positive Expression dieses Rezeptors. Neben der exogenen Zugabe von TGF- $\beta$ 1 in einer Konzentration von 10 ng/ml war der Faktor allerdings auch in nicht unerheblichen Mengen im verwendeten FCS enthalten (Childs et al. 1982). Dies wurde durch eigene Analysen des verwendeten FCS bestätigt (Eigengehalt von TGF- $\beta$ 1  $1,07 \pm 0,02$  ng/ml). Eine konstante Langzeit-Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 könnte im Laufe der Zeit zu einer negativen Feedback-Regulation der zellulären TGF- $\beta$ -Antwort geführt haben, die die geringen Effekte des Wachstumsfaktors auf das Gewebe erklären könnte. So zeigte sich z.B. in entzündlich verändertem Knorpel *ex vivo* eine Reduktion der Rezeptordichte und ein allgemeiner Verlust der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Wachstumsfaktoren (Verschure et al. 1994). Auch für andere mesenchymale Zelltypen wie etwa *in vitro* kultivierte Fibroblasten wurde von einer verminderten Sensitivität gegenüber TGF- $\beta$ 1 infolge einer *In vivo*-Überstimulation

und daraus resultierender Präkonditionierung berichtet (Kikuchi et al. 1992). Alle drei Isoformen von TGF- $\beta$ 1 werden auch von den Chondrozyten selbst produziert (Morales et al. 1991). Die endogene Synthese wird über ein kompliziertes Netzwerk aus einer Vielzahl regulatorisch wirkender Wachstumsfaktoren gesteuert (Villiger und Lotz 1992). Für verschiedene Zelltypen wird dabei eine TGF- $\beta$ 1-vermittelte Autoinduktion seiner eigenen Synthese beschrieben (Bascom et al. 1989, McCartney-Francis et al. 1990, Obberghen-Schilling et al. 1988). Die Steigerung der zelleigenen TGF- $\beta$ 1-Expression durch exogene Zufuhr des Wachstumsfaktors erscheint allerdings limitiert, so dass das Überschreiten bestimmter Konzentrationen im Sinne eines Negativfeedbacks zu einem Rückgang der endogenen TGF- $\beta$ -Synthese führt. Diese Hypothese wird von eigenen Daten zur Untersuchung der knorpeligen TGF- $\beta$ 1-Produktion nach externer Stimulation mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 im Regenerationsmodell untermauert (Abb. 47, Anhang Seite II). Hier zeigte sich im entsprechenden ELISA für die stimulierten Knorpelproben eine über die gesamte Kulturdauer konstante Abnahme des endogenen TGF- $\beta$ 1-Gehaltes auf nur noch 60-70% des relativen Ausgangswertes frischen Knorpels. Im unstimulierten Knorpel hingegen wurde das Niveau des frischen Knorpels über den gesamten Zeitraum von 8 Wochen aufrechterhalten. Inwieweit die Langzeitbehandlung mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) im vorliegenden Modell nun tatsächlich zu einer Überstimulation der Chondrozyten mit negativer Rückkopplung und Verminderung der Rezeptordichte geführt hat, muss in weiteren Studien mittels Durchflusszytometrie oder Immunhistochemie evaluiert werden (Verdier et al. 2005).

### **6.2.3 Chondrozytenproliferation**

Die Datenlage in der Literatur bezüglich des Einflusses von TGF- $\beta$ 1 auf die Proliferation adulter Chondrozyten ist kontrovers (Grimaud et al. 2002). Die meisten Studien berichten von einer prinzipiell proliferationsinduzierenden Wirkung des Wachstumsfaktors auf kultivierte, ausdifferenzierte Chondrozyten verschiedenster Herkunft wie z.B. bovine Gelenkchondrozyten (de Haart et al. 1999), primäre Kaninchenchondrozyten aus Ohr und Rippe (Lee et al. 1997), fetale Pferdechondrozyten (Nixon et al. 1998) oder humane Bandscheibenchondrozyten (Gruber et al. 1997). Abhängig von verschiedenen Kulturparametern wie Differenzierungsgrad (Blanco et al. 1995) und Alter (Guerne et al. 1994) der verwendeten Chondrozyten, Serumanteil im Kulturmedium (Vivien et al. 1991) sowie eingesetzter Stimulationskonzentration von TGF- $\beta$ 1 (Battegay et al. 1990) gibt es jedoch auch Daten zu einer bimodalen Wachstumsinhibition durch TGF- $\beta$ 1. Aufgrund dieser kontroversen

Literaturbefunde wurde in dieser Arbeit die spezifische Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf die Proliferation isolierter Chondrozyten in der Modell- (bovin) und der klinischen Zielspezies (human) unter Anwendung des kommerziell erhältlichen BrdU-Proliferationsassays untersucht [nach (Muir et al. 1990)]. Da diese Methode protokollgemäß in einem Zeitraum von zwei bis drei Tagen durchgeführt wird, konnten serumarme Kulturbedingungen (1% FCS) angewendet und so kostimulierende Effekte der im FCS enthaltenen Komponenten weitestgehend ausgeschlossen werden. Dieses vorbereitende „*Starving*“ ist eine gängige Methode, um die Chondrozyten reversibel im G1-Stadium des Zellzyklus zu arretieren und alle Zellen vor Stimulation mit dem interessierenden Agens auf ein einheitliches Ausgangsniveau zu bringen (Hawker, Jr. 2003, Zhang et al. 2005). Nach Auswertung der gewonnenen Daten konnte sowohl für humane als auch für bovine Chondrozyten eine konzentrationsabhängige Induktion der Zellproliferation durch TGF- $\beta$ 1 detektiert werden. Dabei reagierten humane Chondrozyten mit einer maximal 3,4-fachen Proliferationssteigerung bereits bei 0,1 ng/ml TGF- $\beta$ 1 insgesamt etwas stärker auf den Stimulus als bovine Knorpelzellen, deren maximal 2,1-fache Steigerung der Zellteilungsrate bei einer TGF- $\beta$ 1-Stimulation von 10 ng/ml zu verzeichnen war. Die für humane Chondrozyten eruierten Ergebnisse bestätigten bereits publizierte Daten. So zeigten Battegay *et al.* bereits eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferation von humanen Primärchondrozyten mit einem Maximum bei einer TGF- $\beta$ 1-Stimulation zwischen 0,1 und 0,5 ng/ml und einem basalen Serumanteil von 1% (Battegay et al. 1990). Die hierbei angewandte Methode der [ $^3$ H]-Thymidin-Inkorporation beruht auf dem Einbau radioaktiv markierter DNA-Bausteine in den Zellkern mit anschließender Messung der Radioaktivität und ist mit dem Prinzip des BrdU-Assays vergleichbar. Die Tendenz boviner Chondrozyten, erst auf höhere TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen mit einer maximalen Zellteilungsrate zu reagieren, ist ebenfalls bereits an anderer Stelle belegt. So beschrieben Zimmer *et al.* in vorhergehenden Studien für adulte bovine Chondrozyten ein Proliferationsmaximum von 1 bzw. 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (Zimmer et al. 1995). Die dabei angewandte simultane Ko-Stimulation der Zellen mit Ascorbinsäure und einem Serumanteil von 10% im Basalmedium machen die beiden Studien allerdings nur bedingt vergleichbar. Neben den Speziesunterschieden ist ein Grund für die beobachteten konzentrationsabhängigen Unterschiede im Proliferationsverhalten der beiden Zellspezies zweifellos in den verschiedenen pathophysiologischen Zuständen der verwendeten Chondrozyten zu suchen. Während das bovine Knorpelmaterial aus relativ gesunden Gelenken gewonnen wurde, stammen die humanen Zellen ausschließlich aus osteoarthrotisch verändertem Gewebe. Für humane Chondrozyten ist bekannt, dass TGF- $\beta$ 1

die Proliferation osteoarthrotischer Knorpelzellen wesentlich stärker induziert als jene gesunder Zellen (Jahng et al. 1997), so dass primär eine gesteigerte Sensibilität der pathologisch veränderten humanen Chondrozyten gegenüber dem Wachstumsfaktor vorliegt. Dies könnte die deutliche Proliferationsantwort bei niedrigen Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 trotz geringerer Rezeptorzahl erklären (Daten oben gezeigt).

Als Positivkontrolle wurden im Rahmen der Proliferationsassays für bovine Chondrozyten Testreihen mit 5% FCS im Basalmedium + TGF- $\beta$ 1 mitgeführt. Auf diese Weise konnte gleichzeitig der Effekt der im Regenerationsmodell vorherrschenden Kulturbedingungen auf die Chondrozytenproliferation abgeschätzt werden. Hier zeigte sich ein massiver, wachstumsfaktorunabhängiger, mitogener Serumeffekt, der eine Steigerung der Zellteilungsrate auf etwa das 3,0-fache des Ausgangsniveaus bewirkte und die zuvor dargelegte proliferationssteigernde Wirkung von TGF- $\beta$ 1 maskierte. Im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit TGF- $\beta$ 1 scheint Serum als Kombination einer Vielzahl proliferationsfördernder Wachstumsfaktoren für bovine Chondrozyten also der potentere Induktor des chondralen Wachstums zu sein. Eine ähnlich potente seruminduzierte Proliferationsinduktion wurde bereits für adulte humane Chondrozyten als eigentliche klinische Targetzellen mehrfach belegt (Bujia 1995, Guerne et al. 1994).

#### 6.2.4 Chondrozytenrekrutierung

Für die Etablierung zellfreier Knorpelersatzmaterialien wie BNC ist die *In situ*-Rekrutierung knorpelständiger Chondrozyten aus der Gewebematrix in den Defektbereich unverzichtbar. Nachdem die prinzipielle Fähigkeit von Chondrozyten zur gerichteten Lokomotion bereits in einigen Studien belegt werden konnte (Frenkel et al. 1996, Morales 2007, Shimizu et al. 1997, Takebayashi et al. 1995), bildet der Einsatz chemotaktisch wirksamer Wachstumsfaktoren eine attraktive Option, um die Zellmigration knorpelständiger Chondrozyten in Richtung Defektrand gezielt zu unterstützen und zu beschleunigen. Dabei konnten v.a. IGF-1 (Chang et al. 2003), FGF-2 (Hidaka et al. 2006, Maniwa et al. 2001) und *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) (Mishima und Lotz 2008) als potente Chemoattraktanten für ausdifferenzierte Chondrozyten identifiziert werden. Außerdem wurden Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie, darunter auch TGF- $\beta$ 1, als potente Chemoattraktanten für eine Reihe verschiedener mesenchymaler Zelltypen ermittelt, darunter Fibroblasten (Postlethwaite et al. 1987), glatte Muskelzellen (Koyama et al. 1990), Osteoblasten-artige Zellen (Pfeilschifter et al. 1990) sowie mesenchymale Vorläuferzellen von Chondrozyten (Huang et al. 2002).

Aufgrund zu Projektbeginn fehlender Literaturdaten zur chemotaktischen Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf adulte Chondrozyten wurde in Kooperation mit dem BMBF-Verbundpartner TransTissueTechnologies (Berlin) das Chemotaxisverhalten boviner und humaner Chondrozyten bei TGF- $\beta$ 1-Stimulation untersucht. Bei dem dazu durchgeführten modifizierten *Boyden Chamber Assay* handelt es sich um eine etablierte und oft angewandte Methode zur Messung von Zellmotilität und -invasion (Chen 2005, Falk et al. 1980).

Die Analysen ergaben, dass humanes rekombinantes TGF- $\beta$ 1 unter serumarmen Konditionen weder auf bovine noch auf humane Chondrozyten eine chemotaktische Wirkung ausübt, ein Befund, der für humane Chondrozyten zwischenzeitlich auch durch andere Arbeiten bestätigt werden konnte (Mishima und Lotz 2008). In den Chemotaxis-Assays konnte für keine der untersuchten TGF- $\beta$ 1-Konzentrationen eine statistisch belegbare Steigerung des Migrations-Index boviner oder humaner Chondrozyten nachgewiesen werden. Als potentester Chemoattraktant der Testreihen wurde für beide Zellspezies wiederum allogenes Serum identifiziert, das aufgrund seiner natürlichen Herkunft eine Kombination verschiedenster Chemokine enthält, die vermutlich synergistisch wirken. Dabei rekrutierte Serum die ausdifferenzierten Chondrozyten interessanterweise auch wesentlich robuster als ubiquitär vorkommende Chemokine wie CXCL12 oder CCL25, bei denen die Reaktion der Zellen insgesamt nur sehr schwach ausgeprägt war (Daten nicht gezeigt).

Eine signifikante Steigerung der gerichteten Migration unter 10%iger Serum-Stimulation ist für bovine Chondrozyten aus der Literatur bereits bekannt (Hidaka et al. 2006), TGF- $\beta$ 1 als potentieller Chemoattraktant wurde im bovinen System allerdings noch nicht evaluiert.

Für humane Chondrozyten existiert nur eine einzige vergleichbare Publikation, die den chemotaktischen Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren, darunter auch TGF- $\beta$ 1 und Serum, auf isolierte Gelenkknorpelzellen untersucht hat (Mishima und Lotz 2008). Auch hier wird eine dosis- und zeitabhängige Migrationsinduktion durch Serum in adulten humanen Chondrozyten beschrieben, wobei ein statistisch signifikanter Effekt ebenfalls ab einem Serumanteil von 5% und in ähnlichen Dimensionen wie in den vorliegenden Daten verzeichnet wurde. Die größte chemotaktische Aktivität wurde dabei dem hohen Anteil von PDGF zugeschrieben, das in Humanserum mit einer Konzentration zwischen 15 und 50 ng/ml nachgewiesen wurde (Bowen-Pope et al. 1984) und auch in der genannten Versuchsreihe als potentester isolierter chemotaktischer Faktor für humane Gelenkchondrozyten identifiziert wurde. TGF- $\beta$ 1 hingegen zeigte auch hier keinerlei signifikante Effekte auf die Chondrozytenmigration, was die eigenen Daten unterstützt.

In Zusammenschau aller Ergebnisse muss die Eignung von TGF- $\beta$ 1 als potentielles Chemoattraktans für bovine und humane Chondrozyten also nachhaltig in Frage gestellt werden.

### **6.3 BNC als potentiell zellfreies Knorpelimplantat**

Nach Etablierung eines robusten *In vitro*-Kulturmodells zur langfristigen Knorpelregeneration sollte in diesem Modell die prinzipielle Nutzbarkeit bakterieller Nanocellulose als potentielles Knorpelersatzimplantat getestet werden. Das theoretische Modellkonzept beruhte dabei auf der Defektfüllung eines künstlichen Knorpeldefektes mit zellfreier BNC, der Rekrutierung knorpelständiger Chondrozyten in das Innere des Implantatmaterials sowie der anschließenden Regeneration des Defektes durch die Neusynthese von EZM.

#### **6.3.1 Zellbesiedlung nativer (unmodifizierter) BNC**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass BNC als potentielles Knorpelimplantat durchaus geeignet ist. Die mittels Lichtmikroskopie dokumentierte vermehrte flächige Adhärenz der mobilisierten und migrierten Chondrozyten auf der BNC-Implantatoberfläche in Verbindung mit ihrer positiven Kernfärbung kann als deutlicher Beleg für die Biokompatibilität und die fehlende Toxizität des Materials gewertet werden (Chen et al. 2009, Esguerra et al. 2010, Helenius et al. 2006, Moreira et al. 2009, Zahedmanesh et al. 2011). Außerdem ist die rasterelektronenmikroskopisch dargestellte Morphologie der auf der BNC befindlichen Chondrozyten mit ihrem abgeflachten Zellkörper, granulären Ausstülpungen und langen zytoplasmatischen Fortsätzen als Beleg für aktivierte, adhäre Knorpelzellen anzusehen (Svensson et al. 2005) und weist BNC als adäquaten Adhäsionsuntergrund für Chondrozyten aus hyalinem Knorpel aus. Eine Invasion der mobilisierten Chondrozyten in tiefere Bereiche der Cellulose wurde allerdings nicht beobachtet, da das Fasernetzwerk unmodifizierter BNC wahrscheinlich zu engmaschig ist und sein Porendurchmesser daher in einem kritischen Verhältnis zu den vergleichsweise großen Chondrozyten steht. Eine homogene Verteilung der Zellen im Inneren des Implantates, wie sie für die vollständige Defektregeneration notwendig wäre, erscheint daher mit unmodifizierter BNC nicht möglich. Ähnliche Ergebnisse lieferten statische Zellbesiedlungsversuche unmodifizierter BNC mit isolierten humanen und bovinen Chondrozyten, die im Rahmen struktureller Untersuchungen zum verbesserten Porendesign der BNC-Implantate in Zusammenarbeit mit der Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG

durchgeführt wurden (Ahrem 2009). Ebenso blieben Bestrebungen der eigenen Arbeitsgruppe, isolierte Chondrozyten durch von außen einwirkende Kräfte in das tiefer gelegene Porensystem zu befördern, erfolglos. Sowohl nach Zentrifugation eines mit Zellen besiedelten Celluloseimplantates sowie nach Anlage eines Vakuums waren die Chondrozyten weiterhin nur oberflächlich adhärent und konnten wiederum nicht in tieferen BNC-Schichten detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Da Chondrozyten aufgrund ihrer Funktion und lakunären Einbettung in der EZM gegenüber anderen Zelltypen deutlich träge Proliferations- und Migrationsraten aufweisen, fehlt ihnen eventuell die Fähigkeit zur Einwanderung in tiefere Netzwerkareale. Für Zellen mit höherer Zellteilungs- und Bewegungsaktivität wie Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Myozyten wurde in der Literatur bereits eine Immigrationstiefe von bis zu 100 µm in das Nanofasernetzwerk nativer BNC beschrieben (Bäckdahl et al. 2006, Helenius et al. 2006, Zahedmanesh et al. 2011). Demnach sind derartige Zelltypen in der Lage, die Cellulosefasern durch gerichtete Migrationsbewegungen beiseite zu schieben, um die engmaschige Nanostruktur passieren zu können (Bäckdahl et al. 2006). Alternativ passen die Zellen ihre äußere Form an, um die Engpässe im BNC-Netzwerk zu passieren (Friedl 2004, Wolf et al. 2003). An dieser Stelle muss jedoch unbedingt auf die unterschiedliche Beschaffenheit der beiden äußeren Oberflächen von nativer BNC hingewiesen werden, auf deren Basis ein verschieden ausgeprägtes Einwandern von Zellen beobachtet werden kann. Mikrostrukturelle Untersuchungen ergaben, dass von *G. xylinum* synthetisierte BNC-Vliese an ihrer Oberseite stets ein dicht gepacktes Fasernetzwerk aufweisen, das zusätzlich von einer dünnen Membran versiegelt zu sein scheint. Durch den ständigen Luftkontakt an der Phasengrenze zwischen Luft und Nährmedium ist diese Vlies-Seite ständigen Austrocknungsprozessen ausgesetzt, die als Ursache der partiellen „Verhornung“ der Cellulose angesehen werden (Ahrem 2009). An der Vlies-Unterseite hingegen zeigt sich immer eine als „Präpolymer“ bezeichnete, weitmaschige, gallertartige Netzwerkschicht, die aus den zuerst synthetisierten Celluloseketten besteht. Alle bisher in der Literatur beschriebenen Immigrationsprozesse blieben stets auf diese poröse präpolymere Oberfläche beschränkt. An der kompakten Oberseite der nativen BNC wird die relativ dichte Nanostruktur des Fasernetzwerks für die begrenzte Einwanderung verschiedener tierischer Zellen unter *In vitro*-Bedingungen verantwortlich gemacht und eher ein oberflächliches Anwachsen der Zellen an die Cellulose-Vliese dokumentiert (Bäckdahl et al. 2006, Svensson et al. 2005, Zahedmanesh et al. 2011). In Zusammenschau dieser Ergebnisse kann gesagt werden, dass unmodifizierte BNC aufgrund ihrer biomechanischen und biologischen Eigenschaften als potentielles Knorpelersatzmaterial



durchaus geeignet ist, den Anforderungen an eine passierbare Netzwerkstruktur für die Einwanderung von Chondrozyten strukturell jedoch nicht gerecht wird.

### 6.3.2 *In vitro*-Integration

Wie bei allen regenerativen Knorpeltherapieansätzen wird auch der Erfolg einer Knorpelreparatur mittels BNC letztendlich von der saumlosen Integration des Implantatmaterials in den umgebenden Knorpel abhängen (Enders et al. 2010, Steinert et al. 2007). Die Grundlage hierfür bildet die Einlagerung neu synthetisierter knorpelspezifischer EZM in das Innere des Cellulosenetzwerkes. Dank des enormen Wassergehalts der BNC und des damit verbundenen Quellungsvermögens konnte lichtmikroskopisch über den gesamten Kulturverlauf ein passgenaues „*Bonding*“ der BNC-Inserts an den Defekträndern des Knorpels dokumentiert werden. Weiterhin scheint BNC als gerüstbildende Substanz prinzipiell in der Lage zu sein, die von benachbarten knorpelständigen Chondrozyten gebildete Matrix in ihrem Netzwerk aufzunehmen und dauerhaft dort zu binden. So zeigte sich für die verschiedenen knorpelspezifischen Matrixmarker PG/Aggrecan, COMP und Kol2 immunhistochemisch eine langfristige Einlagerung in randständigen BNC-Bezirken im Sinne einer primären Defektabdichtung. Wichtiger noch als die Matrixeinlagerung von außen erscheint allerdings die *In situ*-Matrixsynthese ausgewanderter Chondrozyten innerhalb der BNC selbst. Die prinzipielle Fähigkeit isolierter Chondrozyten, auf bzw. innerhalb des BNC-Porennetzwerkes zu proliferieren und knorpelspezifische EZM zu synthetisieren, konnte erwartungsgemäß im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (Andersson et al. 2010, Svensson et al. 2005). Auf Transkriptionsebene wurde bei allen drei Knorpelmarkern (Aggrecan, COMP, Kol2) eine kontinuierliche mRNA-Expressionsinduktion in den auf die BNC migrierten Chondrozyten nachgewiesen. Besonders eindrucksvoll war in diesem Zusammenhang die redifferenzierende bzw. stabilisierende Wirkung von BNC auf den chondrozytären Phänotyp der migrierten Zellen, die eine minimale Kol1-mRNA-Expression in den adhären Zellen bewirkte. In dieser Hinsicht könnte BNC alternativen Scaffoldmaterialien wie Polylactid/Polydioxanon-Polymeren eventuell überlegen sein, die zwar nach Aussaat dedifferenzierter Chondrozyten zu einer Plateaubildung der Kol1-mRNA-Expression führten, allerdings keine echte Redifferenzierung im Sinne einer Unterdrückung der Kol1-mRNA-Synthese bewirkten (Kaps et al. 2004).

Trotz des damit grundsätzlich erbrachten „*Proof of concept*“ bezüglich der Eignung von BNC als potentielltes Knorpelimplantat erscheint eine Kulturdauer von 8 Wochen für eine

suffiziente *In vitro*-Integration der BNC-Zylinder nicht ausreichend, insbesondere bezüglich der Anzahl ausgewanderter Zellen und der Diffusionsstrecken für die eingelagerte Matrix. Separat durchgeführte biomechanische Testungen (Ausdrückversuche) ergaben nach einer Kulturdauer von 10 Wochen bereits Hinweise auf eine initiale Integration der nativen BNC-Zylinder im Knorpelring (Ruediger et al. 2011). Für eine stabile und robuste Integration des Implantates in das umgebende Gewebe sind jedoch wesentlich längere Zeiträume erforderlich, was die möglichen klinischen Vorteile eines nicht-resorbierbaren Implantattyps unterstreicht.

### 6.3.3 Zellbesiedlung modifizierter BNC

Zur erfolgreichen Entwicklung von Knorpelimplantaten aus BNC-Hydrogelen ist die Form und Porengröße des Cellulose-Netzwerkes entscheidend, um die Einwanderung und Vermehrung von ortsständigen Knorpelzellen zu ermöglichen. Die Projektarbeiten haben zu der eindeutigen Antwort geführt, dass für das Einwandern von Zellen Poren- oder Kanalsysteme im Durchmesserbereich von 10 - 100 µm erforderlich sind. Native BNC-Hydrogele, die unter Standardbedingungen biosynthetisiert wurden, weisen in Abhängigkeit vom verwendeten *Gluconacetobacter*-Stamm jedoch eine offene, irreguläre Maschenstruktur mit Durchmessern von lediglich 1 – 6 µm auf. Auf der Grundlage der beschriebenen, deutlich limitierten Zellmigration in das Innere nativer BNC-Vliese wurden parallele Strategien verfolgt, um das Porensystem der BNC an ein optimiertes Einwandern von Chondrozyten in das Implantatmaterial anzupassen.

Die Anwendung von Porogenen und anschließender *Leaching*-Techniken wurde bereits in mehreren Forschungsgruppen zur Anfertigung von porösen Scaffoldmaterialien genutzt (Chen et al. 2001, Ma und Choi 2001, Zhou et al. 2005) und auch erfolgreich im Rahmen der modifizierten Synthese von BNC eingesetzt (Andersson et al. 2010, Bäckdahl et al. 2008). Eine Penetration von Zellen in die mikroporösen Celluloseschichten erschien dabei prinzipiell möglich. Porogene agieren als sog. Platzhalter und werden während der Biosynthese der BNC in Form von „*Microspheres*“ in das Cellulosenetzwerk eingebaut. Nach anschließender Herauslösung (*Leaching*) hinterlassen sie ein Hohlraumsystem mit deutlich gesteigerter Einzelporengröße. Durch die Inkorporation von Gelatine- und Paraffin-Porogenen und anschließendes Herauslösen während der Kultivierung gelang es der Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG im Rahmen der Projekt-Zusammenarbeit, eine hochporöse und interkonnektierende Netzwerkstruktur mit definierter Porengröße und vergrößerter innerer Oberfläche zu schaffen (Ahrem 2009). Die im anschließenden Zellbesiedlungsversuch

beobachtete Invasionstiefe isolierter Chondrozyten von etwa 200  $\mu\text{m}$  war gegenüber unmodifizierter BNC nennenswert verbessert und lag in einer mit den Literaturdaten vergleichbaren Größenordnung (Bäckdahl et al. 2008). Dennoch war der Anteil der in die Poren immigrierten Zellen im Verhältnis zur initial applizierten Zellzahl und den auf der Celluloseoberfläche adhärenen Zellen nicht zufriedenstellend. Trotz der Schaffung deutlich größerer Einzelporen ist weiterhin vom Vorhandensein einer oberflächlichen Penetrationsbarriere auszugehen, wie sie schon für native BNC beschrieben wurde. Die Überwindung der dichten Membran und die Invasion in die mikroporöse Schicht wurden vermutlich durch vereinzelte Perforationen in diesem versiegelnden Häutchen ermöglicht, durch die sich die Chondrozyten ihren Weg in das Hohlraumssystem bahnten. Auch andere Autoren beschreiben die prinzipielle Fähigkeit von Chondrozyten, interkonnektierende Poren zu infiltrieren, solange ein offener Zugang besteht. Bereiche ohne bzw. mit nur wenigen eröffneten Poren auf der BNC-Oberfläche hingegen zeigten lediglich oberflächlich adhärenente Zelllagen, jedoch keine Zeichen von Zellinvasion (Andersson et al. 2010). In Zusammenschau aller Daten kann die Modifikation des BNC-Porensystems mittels Porogenen keine ausreichende dreidimensionale Implantatbesiedlung mit Chondrozyten gewährleisten, da ein systematisches Einwandern von Chondrozyten immer noch durch eine für die Zellen undurchdringbare Celluloseschicht an der Oberfläche verhindert wird.

Als erfolgversprechendstes Modifikationskonzept zur Schaffung dreidimensional besiedelbarer BNC-Vliese hat sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die postsynthetische Laserbehandlung herausgestellt. Aus patentrechtlichen Gründen sei an dieser Stelle bezüglich methodischer und technischer Umsetzung auf Veröffentlichungen der Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG verwiesen. Dank des entwickelten Verfahrens war es möglich, die besprochene Membranbarriere an der Oberfläche der BNC gezielt zu perforieren und das gesamte Implantat durchdringende Kanalstrukturen zu generieren, die sich *in vitro* optimal mit isolierten Chondrozyten besiedeln ließen.

Mikrostrukturelle Untersuchungen mittels REM wiesen darauf hin, dass die Kanalinnenflächen durch den Wärmeeintrag des Lasers auf gewisse Weise „verkochen“, was zur Aggregation einzelner Cellulose-Fasern führt. Bisherige Zellbesiedlungen mit Chondrozyten haben jedoch gezeigt, dass Zellen auf den verdichteten Cellulose-Strukturen gut adhären und eine vitale Morphologie aufweisen. Zwar ist in Anbetracht der vorherigen Ergebnisse nicht davon auszugehen, dass Chondrozyten in der Lage sind, diese verdichtete Kanalinnenfläche noch weiter zu passieren. Dennoch erscheint die dreidimensionale Besiedlung des Implantates mit Chondrozyten innerhalb des Hohlraumssystems aufgrund der

großen inneren Oberfläche und der wesentlich kürzeren Diffusionsstrecken durchaus als ausreichend, um eine annähernd stabile Defektauffüllung mit neu synthetisierter Knorpelmatrix zu erreichen. Diese Hypothese wird durch die massive Ablagerung von neu gebildeter EZM an den Kanalflächen unterstützt.

#### **6.4 Beitrag knorpelständiger MPZ zur endogenen *In situ*-Regeneration von Gelenkknorpel**

Die Grundlage für eine endogene *In situ*-Regeneration von Knorpeldefekten auf der Basis zellfreier Implantatmaterialien bildet ohne Zweifel die Existenz ortsständiger Zellen mit der Kapazität zur Proliferation und Matrixsynthese. Da im Gegensatz zu anderen Geweben das Vorkommen von MPZ mit chondrogenem Differenzierungspotential im Knorpel aber erst seit wenigen Jahren bekannt ist, liegen bisher nur wenige fundierte Untersuchungen vor. Bestrebungen der eigenen Arbeitsgruppe galten daher der genaueren Quantifizierung und Lokalisierung knorpelständiger MPZ und der Evaluierung ihres Regenerationspotentials unter Nutzung der beiden Oberflächenmarker CD105 und CD166, die sich in der Literatur bereits zu einer robusten Markerkombination für pluripotente MPZ im Knorpelgewebe entwickelt haben (Alsalameh et al. 2004).

Im erweiterten Rahmen dieser Arbeit gelang es, CD166 als alleinigen Marker für knorpelständige MPZ im humanen Knorpel zu etablieren (Pretzel et al. 2011). Dabei wurde mit durchschnittlich 17% bzw.  $15\% \pm 2\%$  ein deutlich höherer Gehalt von CD166<sup>+</sup> Zellen innerhalb des osteoarthrotischen bzw. gesunden humanen Gelenkknorpels nachgewiesen als bisher von Fickert *et al.* mit 2-12% (Fickert et al. 2004) bzw. Alsalameh *et al.* mit ca. 7,5% (Alsalameh et al. 2004) beschrieben. In Differenzierungs-Assays bewiesen diese Zellen in Abhängigkeit von den entsprechenden Kulturbedingungen ein osteogenes und adipogenes, aber v.a. ein gesteigertes chondrogenes Differenzierungspotential. Die Existenz dieser beachtlichen Anteile an ortsständigen pluripotenten Zellen legt eine bisher unerschlossene Regenerationskapazität im Knorpel nahe, die speziell im OA-Knorpel von pathophysiologischem und eventuell therapeutischem Interesse sein könnte.

Interessanterweise waren die CD166<sup>+</sup> Chondrozyten nahezu ausschließlich in der Superficial- und Transitionalzone humanen Gelenkknorpels lokalisiert und dort relativ homogen verteilt. Diese regionale Häufung knorpelständiger MPZ in den oberen Knorpelschichten wurde unter Nutzung anderer Oberflächenmarker (z.B. Notch-1, Stro-1, VCAM-1) zuvor bereits im Rattenknorpel (Ozbey et al. 2009) sowie im bovinen (Dowthwaite et al. 2004) und humanen

(Grogan et al. 2009) Knorpel beschrieben. In der Tat scheint die oberflächliche Knorpelzone in der frühen postnatalen Entwicklung von zentraler Bedeutung für das Wachstum des Gelenkknorpels zu sein. Hunziker *et al.* postulierten, dass die Superfizialzone des Knorpels aus sich langsam teilenden Stammzellen mit bidirektionaler mitotischer Aktivität bestünde (Hunziker et al. 2007). Demnach werde in horizontaler Richtung der Stammzellpool mit neuen mitotisch aktiven Zellen aufgefüllt und gleichzeitig eine laterale Expansion der Knorpelschicht bewirkt. In vertikaler Richtung hingegen lieferten sie permanent Tochterzellen für den Zellumsatz der Transitional- und Radialzone nach. Auch andere Autoren beschreiben ein vorwiegend von der oberflächlichen Knorpelschicht ausgehendes appositionelles Knorpelwachstum und gehen von einer dort lokalisierten Progenitorzellpopulation aus (Hayes et al. 2001).

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die vorwiegend superfiziale Lokalisation residenter MPZ im humanen Gelenkknorpel eröffnen neben dem akademischen Zugewinn auch die Möglichkeit zum verbesserten Design von matrix-gekoppelten Knorpelimplantaten. Speziell die Anpassung ihres dreidimensionalen Designs an die MPZ-Architektur innerhalb des Gelenkknorpels, die Supplementierung chondroinduktiver bioaktiver Faktoren bzw. die optimierte Implantatbesiedlung mit isolierten knorpeligenen MPZ (Kreuz et al. 2009, Wakitani et al. 1994) stellen innovative Strategien zur verbesserten matrixbasierten Knorpelregeneration dar.

Bezüglich der angestrebten Entwicklung eines zellfreien Knorpelersatzimplantates auf der Basis von BNC könnte die spezifische Verteilung der MPZ z. B. einen maßgeblichen Einfluss auf die Gestaltung der BNC, v.a. bezüglich der Verteilung der Porengrößen, haben. Während die Implantatbereiche in unmittelbarem Kontakt zur superfiziellen und mittleren Knorpelschicht eine möglichst weitporige, besiedlungsfreundliche Porenstruktur für die benachbarten, residenten MPZ bieten sollte, wäre eventuell die Synthese einer engmaschigen BNC-Schicht als Verstärkung des knochenzugewandten Implantatbodens wünschenswert, um eine unkomplizierte und zuverlässige Materialfixierung zu gewährleisten.

## 7 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines *In vitro*-Modells zur langfristigen Kultur von Knorpelimplantaten, mithilfe dessen die prinzipielle Eignung von BNC als potentiell zellfreies Knorpelimplantat untersucht werden sollte. Gleichzeitig galt es, den konzeptionellen Beitrag des bioaktiven Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ 1 zur Chondrozytenrekrutierung, -proliferation und Matrixsynthese in diesem Modell zu evaluieren.

Unter Berücksichtigung aller Daten lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Das hier beschriebene *In vitro*-Modell stellt eine geeignete Methode zur langfristigen Analyse der endogenen Regenerationskapazität nativen Gelenkknorpels dar, die dem initialen Anspruch an die Schaffung eines robusten und universell anwendbaren Modell-Prototyps für die Testung zellfreier Knorpelersatzmaterialien in hohem Maße gerecht wird. Es ist durch Basisbedingungen gekennzeichnet, die eine langfristige Knorpelkultur ohne Beeinflussung der Zellvitalität bzw. Einsetzen dedifferenzierender bzw. degradierender Begleitprozesse in der Matrix gewährleistet. Der Knorpel reagiert auf die initiale Defektschließung mit gewebstypischer kompensatorischer Gegensteuerung (Proliferation mit Clusterbildung, gesteigerte Matrixsynthese nahe der Traumazone, Verminderung kataboler Prozesse) und imitiert dabei eindrucksvoll die natürlichen Regenerationsversuche *in vivo*.
- Nach der *In vitro*-Testung nativer BNC im Regenerationsmodell erscheint Bakteriencellulose als potentiell geeignetes Knorpelimplantat prinzipiell geeignet. Eine im Kulturverlauf vermehrte flächige Adhärenz von mobilisierten und migrierten Chondrozyten aus der Knorpelmatrix auf der BNC-Implantatoberfläche in Verbindung mit ihrer positiven Kernfärbung kann als deutlicher Beleg für die Biokompatibilität und die fehlende Toxizität des Materials gewertet werden. Die randständige Einlagerung neu synthetisierter Matrixmoleküle in das BNC-Netzwerk spricht eindeutig für eine beginnende Integration des Implantates in den Knorpel. Zudem wurde eine redifferenzierende bzw. den chondrozytären Phänotyp stabilisierende Wirkung der BNC auf adhärente Zellen detektiert. Eine Invasion der Chondrozyten in tiefer gelegene BNC-Schichten wurde allerdings bei unmodifizierter BNC, wahrscheinlich aufgrund eines zu engmaschigen Cellulose-Netzwerks, nicht beobachtet. Das native Biomaterial bedarf daher für eine dreidimensionale Besiedlung mit Zellen einer grundlegenden Optimierung seines Porendesigns. In Anbetracht der derzeitigen Datenlage stellen Laser-modifizierte BNC-Vliese den finalen Implantat-Prototypen dar, der sich *in vitro* optimal und dreidimensional mit isolierten

Chondrozyten besiedeln ließ.

- Die Eignung von TGF- $\beta$ 1 als potentieller bioaktiver Implantatfaktor muss unter Berücksichtigung aller Daten in Frage gestellt werden. Bezüglich der zur Etablierung zellfreier Knorpelersatzmaterialien unverzichtbaren *In situ*-Rekrutierung knorpelständiger Chondrozyten zeigte TGF- $\beta$ 1 im Gegensatz zu Serum keinerlei chemotaktische Wirkung. Die proliferationsinduzierende TGF- $\beta$ 1-Wirkung auf isolierte Chondrozyten wurde wiederum von Serum deutlich übertroffen. Ebenso wurde hinsichtlich der Synthese von Knorpelmatrixkomponenten kein deutlich positiver Einfluss von TGF- $\beta$ 1 gegenüber der notwendigen Basisstimulation mit 5% Serum beobachtet. Insgesamt stellt Serum also im Modell einen deutlich potenteren Induktor essentieller Prozesse in der Knorpelregeneration und damit eine attraktive Alternative zur Bioaktivierung der BNC-Implantate dar.

Der therapeutische Nutzen von BNC im Rahmen der regenerativen Knorpelersatztherapie wird gegenwärtig positiv eingeschätzt. Offen bleibt die Frage nach einer ausreichend hohen Anzahl emigrierender Chondrozyten aus der Knorpelmatrix, um eine Produktentwicklung als zellfreien Therapieansatz zu ermöglichen. Die prinzipielle Mobilisations- und Migrationsfähigkeit knorpelständiger Chondrozyten sowie die 3D-Besiedelbarkeit Laser-behandelter BNC wurden im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen. Bei letzteren Besiedlungsversuchen mit isolierten Chondrozyten wurden die Zellen allerdings v.a. durch äußere Sedimentations- und Scherkräfte passiv in die gelaserten Kanalstrukturen transportiert. Inwieweit mobilisierte knorpelständige Chondrozyten aktiv den Weg durch das vorgefertigte Hohlraumssystem in das Implantatinnere finden, muss in nachfolgenden *In vitro*-Studien im hier dargestellten Regenerationsmodell untersucht werden.

Weiterhin muss geklärt werden, in welcher Form die Bioaktivierung der Implantate mittels Serum vollzogen werden soll. Eine Bioaktivierung im Sinne eines „autologen Implantat-*Primings*“ mit patienteneigenem Serum könnte sich als sichere, kostengünstige und regulatorisch unbedenkliche Variante erweisen und würde erst unmittelbar vor Applikation durch Inkubation der BNC in autologem Serum erfolgen, das problemlos und kostengünstig während der OP gewonnen werden kann.

Das Gesamtergebnis dieser Arbeit verdeutlicht den weiten Weg vom Grundkonzept bis zur finalen Produktentwicklung eines funktionierenden Knorpelersatzes auf der Basis von BNC. Die Nutzung als zellfreier Therapieansatz wird in den nächsten Jahren eine große Herausforderung darstellen, deren Erfolg letztendlich nur unter *In vivo*-Bedingungen endgültig belegt werden kann.

## LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. 2009. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*, 17(6):705-713.
- Ahrem H. 2009. Strukturdesign bakterieller Nanocellulose zur verbesserten Chondrozyten-Besiedlung für die Entwicklung von Knorpelimplantaten [Diplomarbeit]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Allen MJ, Houlton JE, Adams SB, Rushton N. 1998. The surgical anatomy of the stifle joint in sheep. *Vet Surg*, 27(6):596-605.
- Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. 2004. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum*, 50(5):1522-1532.
- Anders JO, Mollenhauer J, Beberhold A, Kinne RW, Venbrocks RA. 2009. Gelatin-based haemostyptic Spongostan as a possible three-dimensional scaffold for a chondrocyte matrix? An experimental study with bovine chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br*, 91B(3):409-416.
- Andersson J, Stenhamre H, Backdahl H, Gatenholm P. 2010. Behavior of human chondrocytes in engineered porous bacterial cellulose scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 94(4):1124-1132.
- Angele P, Yoo JU, Smith C, Mansour J, Jepsen KJ, Nerlich M, Johnstone B. 2003. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res*, 21(3):451-457.
- Aulthouse AL, Beck M, Griffey E, Sanford J, Arden K, Machado MA, Horton WA. 1989. Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol*, 25(7):659-668.
- Aurich M, Squires GR, Reiner A, Mollenhauer JA, Kuettner KE, Poole AR, Cole AA. 2005. Differential matrix degradation and turnover in early cartilage lesions of human knee and ankle joints. *Arthritis Rheum*, 52(1):112-119.
- Bäckdahl H, Esguerra M, Delbro D, Risberg B, Gatenholm P. 2008. Engineering microporosity in bacterial cellulose scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med*, 2(6):320-330.
- Bäckdahl H, Helenius G, Bodin A, Nannmark U, Johansson BR, Risberg B, Gatenholm P. 2006. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials*, 27(9):2141-2149.



- Barone-Varelas J, Schnitzer TJ, Meng Q, Otten L, Thonar EJ. 1991. Age-related differences in the metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants maintained in the presence of insulin-like growth factor I. *Connect Tissue Res*, 26(1-2):101-120.
- Bascom CC, Wolfshohl JR, Coffey RJ, Jr., Madisen L, Webb NR, Purchio AR, Derynck R, Moses HL. 1989. Complex regulation of transforming growth factor beta 1, beta 2, and beta 3 mRNA expression in mouse fibroblasts and keratinocytes by transforming growth factors beta 1 and beta 2. *Mol Cell Biol*, 9(12):5508-5515.
- Battegay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R. 1990. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell*, 63(3):515-524.
- Behrens P, Bosch U, Bruns J, Erggelet C, Esenwein SA, Gaissmaier C, Krackhardt T, Lohnert J, Marlovits S, Meenen NM, Mollenhauer J, Nehrer S, Niethard FU, Noth U, Perka C, Richter W, Schafer D, Schneider U, Steinwachs M, Weise K. 2004. [Indications and implementation of recommendations of the working group "Tissue Regeneration and Tissue Substitutes" for autologous chondrocyte transplantation (ACT)]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 142(5):529-539.
- Benya PD, Shaffer JD. 1982. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 30(1):215-224.
- Bhosale, A. M. and Richardson, J. B. 2008. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br.Med Bull.*, 87:77-95.
- Billinghurst RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, VanWart H, Poole AR. 1997. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest*, 99(7):1534-1545.
- Blanco FJ, Geng Y, Lotz M. 1995. Differentiation-Dependent Effects of Il-1 and Tgf-Beta on Human Articular Chondrocyte Proliferation Are Related to Inducible Nitric-Oxide Synthase Expression. *J Immunol*, 154(8):4018-4026.
- Bodin A, Concaro S, Brittberg M, Gatenholm P. 2007. Bacterial cellulose as a potential meniscus implant. *J Tissue Eng Regen Med*, 1(5):406-408.
- Bowen-Pope, DF, Malpass, TW, Foster, DM, and Ross, R. 1984. Platelet-derived growth factor in vivo: levels, activity, and rate of clearance . *Blood*, 64:458-469.
- Boyd FT, Massague J. 1989. Transforming growth factor-beta inhibition of epithelial cell proliferation linked to the expression of a 53-kDa membrane receptor. *J Biol Chem*, 264(4):2272-2278.
- Britt JC, Park SS. 1998. Autogenous tissue-engineered cartilage - Evaluation as an implant material. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 124(6):671-677.

- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. 1994. Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *N Engl J Med*, 331(14):889-895.
- Brittberg, M. and Winalski, C. S. 2003. Evaluation of cartilage injuries and repair. *J Bone Joint Surg.Am.*, 85-A Suppl 2:58-69.
- Brown, A. F. 1982. Neutrophil granulocytes: adhesion and locomotion on collagen substrata and in collagen matrices. *J Cell Sci*, 58:455-467.
- Brown, A. J. 1886. On an acetic ferment which forms cellulose . *J Chem Soc*, 49:432-439.
- Brown, W. E., Potter, H. G., Marx, R. G., Wickiewicz, T. L., and Warren, R. F. 2004. Magnetic resonance imaging appearance of cartilage repair in the knee. *Clin Orthop Relat Res*, 422:214-223.
- Bruns J, Kersten P, Silbermann M, Lierse W. 1997. Cartilage-flow phenomenon and evidence for it in perichondrial grafting. *Arch Orthop Trauma Surg*, 116(1-2):66-73.
- Buckwalter JA, Lohmander S. 1994. Operative treatment of osteoarthritis. Current practice and future development. *J Bone Joint Surg Am*, 76(9):1405-1418.
- Buckwalter, J. A. and Mankin, H. J. 1998a. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect*, 47:487-504.
- Buckwalter, J. A. and Mankin, H. J. 1998b. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*, 47:477-486.
- Bujia J. 1995. [Effect of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis in cultured human chondrocytes]. *Laryngorhinootologie*, 74(7):444-449.
- Bujia J, Pitzke P, Kastenbauer E, Wilmes E, Hammer C. 1996. Effect of growth factors on matrix synthesis by human nasal chondrocytes cultured in monolayer and in agar. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 253(6):336-340.
- Bujia J, Sittinger M, Wilmes E, Hammer C. 1994. Effect of growth factors on cell proliferation by human nasal septal chondrocytes cultured in monolayer. *Acta Otolaryngol*, 114(5):539-543.
- Bullough P, Goodfellow J. 1968. The significance of the fine structure of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br*, 50(4):852-857.
- Calandruccio RA, Gilmer WS. 1962. Proliferation, Regeneration, and Repair of Articular Cartilage of Immature Animals. *J Bone Joint Surg Am*, 44(3):431-455.

- Campbell, C. J. 1969. The healing of cartilage defects. *Clin Orthop Relat Res*, 64:45-63.
- Camplejohn KL, Allard SA. 1988. Limitations of safranin 'O' staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry*, 89(2):185-188.
- Cancedda, R., Descalzi, Cancedda F., and Castagnola, P. 1995. Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol*, 159:265-358.
- Chandrasekhar S, Esterman MA, Hoffman HA. 1987. Microdetermination of proteoglycans and glycosaminoglycans in the presence of guanidine hydrochloride. *Anal Biochem*, 161(1):103-108.
- Chang C, Lauffenburger DA, Morales TI. 2003. Motile chondrocytes from newborn calf: migration properties and synthesis of collagen II. *Osteoarthritis Cartilage*, 11(8):603-612.
- Chen G, Ushida T, Tateishi T. 2001. Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering. *Mater Sci Eng C Biomimet Supramol Syst*, C17(1-2):63-69.
- Chen, HC. 2005. Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol*, 294:15-22.
- Chen, Y. M., Xi, T. F., Zheng, Y. D., Guo, T. T., Hou, J. Q., Wan, Y. Z., and Gao, C. 2009. In Vitro Cytotoxicity of Bacterial Cellulose Scaffolds Used for Tissue-engineered Bone. *J Bioact Compat Pol*, 24:137-145.
- Chevalier X. 1993. Fibronectin, cartilage, and osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 22(5):307-318.
- Childs CB, Proper JA, Tucker RF, Moses HL. 1982. Serum contains a platelet-derived transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79(17):5312-5316.
- Choi YC, Morris GM, Lee FS, Sokoloff L. 1980. The effect of serum on monolayer cell culture of mammalian articular chondrocytes. *Connect Tissue Res*, 7(2):105-112.
- Chua, K. H., Aminuddin, B. S., Fuzina, N. H., and Ruszymah, B. H. 2005. Insulin-transferrin-selenium prevent human chondrocyte dedifferentiation and promote the formation of high quality tissue engineered human hyaline cartilage. *Eur Cell Mater*, 9:58-67.
- Chubinskaya S, Huch K, Schulze M, Otten L, Aydelotte MB, Cole AA. 2001. Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *J Histochem Cytochem*, 49(10):1211-1220.
- Correia CR, Moreira-Teixeira LS, Moroni L, Reis RL, van Blitterswijk CA, Karperien M, Mano JF. 2011. Chitosan scaffolds containing hyaluronic Acid for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*, 17(7):717-730.

- Czaja WK, Young DJ, Kawecki M, Brown RM, Jr. 2007. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules*, 8(1):1-12.
- Darling EM, Athanasiou KA. 2005. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J Orthop Res*, 23(2):425-432.
- Davies LC, Blain EJ, Caterson B, Duance VC. 2008. Chondroitin sulphate impedes the migration of a sub-population of articular cartilage chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 16(8):855-864.
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*, 44(8):1928-1942.
- de Haart M, Marijnissen WJCM, van Osch GJVM, Verhaar JAN. 1999. Optimization of chondrocyte expansion in culture - Effect of TGF beta-2, bFGF and L-ascorbic acid on bovine articular chondrocytes. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 70(1):55-61.
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS. 2000. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage*, 8(5):309-334.
- Delot E, Brodie SG, King LM, Wilcox WR, Cohn DH. 1998. Physiological and pathological secretion of cartilage oligomeric matrix protein by cells in culture. *J Biol Chem*, 273(41):26692-26697.
- DePalma, A. F., McKeever, C. D., and Subin, D. K. 1966. Process of repair of articular cartilage demonstrated by histology and autoradiography with tritiated thymidine. *Clin Orthop Relat Res*, 48:229-242.
- Derynck R. 1994. TGF-beta-receptor-mediated signaling. *Trends Biochem Sci*, 19(12):548-553.
- Dickinson SC, Vankemmelbeke MN, Buttle DJ, Rosenberg K, Heinegard D, Hollander AP. 2003. Cleavage of cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) by matrix metalloproteinases and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs. *Matrix Biol*, 22(3):267-278.
- Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, Haughton L, Bayram Z, Boyer S, Thomson B, Wolfe MS, Archer CW. 2004. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci*, 117(Pt 6):889-897.
- Dunn GA, Ebendal T. 1978. Contact guidance on oriented collagen gels. *Exp Cell Res*, 111(2):475-479.
- Elima K, Vuorio E. 1989. Expression of mRNAs for collagens and other matrix components in dedifferentiating and redifferentiating human chondrocytes in culture. *FEBS Lett*, 258(2):195-198.

- Enders JT, Otto TJ, Peters HC, Wu J, Hardouin S, Moed BR, Zhang Z. 2010. A model for studying human articular cartilage integration in vitro. *J Biomed Mater Res A*, 94(2):509-514.
- Erggelet C, Endres M, Neumann K, Morawietz L, Ringe J, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps C. 2009. Formation of cartilage repair tissue in articular cartilage defects pretreated with microfracture and covered with cell-free polymer-based implants. *J Orthop Res*, 27(10):1353-1360.
- Erggelet C, Neumann K, Endres M, Haberstroh K, Sittinger M, Kaps C. 2007. Regeneration of ovine articular cartilage defects by cell-free polymer-based implants. *Biomaterials*, 28(36):5570-5580.
- Esguerra M, Fink H, Laschke MW, Jeppsson A, Delbro D, Gatenholm P, Menger MD, Risberg B. 2010. Intravital fluorescent microscopic evaluation of bacterial cellulose as scaffold for vascular grafts. *J Biomed Mater Res A*, 93(1):140-149.
- Estreicher A, Muhlhauser J, Carpentier JL, Orci L, Vassalli JD. 1990. The receptor for urokinase type plasminogen activator polarizes expression of the protease to the leading edge of migrating monocytes and promotes degradation of enzyme inhibitor complexes. *J Cell Biol*, 111(2):783-792.
- Eyre D. 2002. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*, 4(1):30-35.
- Falk W, Goodwin RH, Leonard EJ. 1980. A 48-Well Micro Chemotaxis Assembly for Rapid and Accurate Measurement of Leukocyte Migration. *J Immunol Methods*, 33(3):239-247.
- Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. 2003. Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. *Osteoarthritis Cartilage*, 11(11):790-800.
- Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. 2004. Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. *Arthritis Res Ther*, 6(5):R422-R432.
- Fiedler J, Roderer G, Gunther KP, Brenner RE. 2002. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem*, 87(3):305-312.
- Fife RS. 1988. Identification of cartilage matrix glycoprotein in synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 31(4):553-556.
- Fontana, J. D., de Souza, A. M., Fontana, C. K., Torriani, I. L., Moreschi, J. C., Gallotti, B. J., de Souza, S. J., Narcisco, G. P., Bichara, J. A., and Farah, L. F. 1990. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl Biochem Biotechnol*, 24-25:253-264.

- Fortier LA, Nixon AJ, Mohammed HO, Lust G. 1997. Altered biological activity of equine chondrocytes cultured in a three-dimensional fibrin matrix and supplemented with transforming growth factor beta-1. *Am J Vet Res*, 58(1):66-70.
- Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, Langer R. 1994. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology (N Y)*, 12(7):689-693.
- Frenkel SR, Clancy RM, Ricci JL, Di Cesare PE, Rediske JJ, Abramson SB. 1996. Effects of nitric oxide on chondrocyte migration, adhesion, and cytoskeletal assembly. *Arthritis Rheum*, 39(11):1905-1912.
- Friedl P. 2004. Dynamic imaging of cellular interactions with extracellular matrix. *Histochem Cell Biol*, 122(3):183-190.
- Fritz J, Gaissmaier C, Schewe B, Weise K. 2005. [Significance and technique of autologous chondrocyte transplantation]. *Zentralbl Chir*, 130(4):327-332.
- Gaissmaier, C, Fritz, J, Schewe, B, Albrecht, D, and Weise, K. 2005. Development of a Novel Collagen-Based Biphasic Carrier for Matrix-Assisted Transplantation of Autologous Chondrocytes. *Akt Traumatol*, 35:267-273.
- Galera P, Redini F, Vivien D, Bonaventure J, Penfornis H, Loyau G, Pujol JP. 1992a. Effect of Transforming Growth Factor-Beta-1 (Tgf-Beta-1) on Matrix Synthesis by Monolayer-Cultures of Rabbit Articular Chondrocytes During the Dedifferentiation Process. *Exp Cell Res*, 200(2):379-392.
- Galera P, Vivien D, Pronost S, Bonaventure J, Redini F, Loyau G, Pujol JP. 1992b. Transforming Growth Factor-Beta-1 (Tgf-Beta-1) Up-Regulation of Collagen Type-Ii in Primary Cultures of Rabbit Articular Chondrocytes (Rac) Involves Increased Messenger-Rna Levels Without Affecting Messenger-Rna Stability and Procollagen Processing. *J Cell Physiol*, 153(3):596-606.
- Gelber AC, Hochberg MC, Mead LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ. 2000. Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis. *Ann Intern Med*, 133(5):321-328.
- Gelse K, Muhle C, Franke O, Park J, Jehle M, Durst K, Goken M, Hennig F, von der Mark K, Schneider H. 2008. Cell-based resurfacing of large cartilage defects. *Arthritis Rheum*, 58(2):475-488.
- Glant TT, Mikecz K, Roughley PJ, Buzas E, Poole AR. 1986. Age-related changes in protein-related epitopes of human articular-cartilage proteoglycans. *Biochem J*, 236(1):71-75.
- Goldberg AJ, Lee DA, Bader DL, Bentley G. 2005. Autologous chondrocyte implantation. Culture in a TGF-beta-containing medium enhances the re-expression of a

- chondrocytic phenotype in passaged human chondrocytes in pellet culture. *J Bone Joint Surg Br*, 87(1):128-134.
- Gomez-Camarillo MA, Almonte-Becerril M, Vasquez TM, Tapia-Ramirez J, Kouri Flores JB. 2009. Chondrocyte proliferation in a new culture system. *Cell Prolif*, 42(2):207-218.
- Gosiewska A, Rezania A, Dhanaraj S, Vyakarnam M, Zhou J, Burtis D, Brown L, Kong W, Zimmerman M, Geesin JC. 2001. Development of a three-dimensional transmigration assay for testing cell--polymer interactions for tissue engineering applications. *Tissue Eng*, 7(3):267-277.
- Grimaud E, Heymann D, Redini F. 2002. Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism - Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders. *Cytokine Growth Factor Rev*, 13(3):241-257.
- Grodzinsky, A. J., Levenston, M. E., Jin, M., and Frank, E. H. 2000. Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces. *Annu Rev Biomed Eng*, 2:691-713.
- Grogan SP, Miyaki S, Asahara H, D'Lima DD, Lotz MK. 2009. Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 11(3):R85-
- Gruber HE, Fisher EC, Desai B, Stasky AA, Hoelscher G, Hanley EN. 1997. Human intervertebral disc cells from the annulus: Three-dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF-beta 1. *Experimental Cell Research*, 235(1):13-21.
- Guerne PA, Sublet A, Lotz M. 1994. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts. *J Cell Physiol*, 158(3):476-484.
- Gurdon JB. 1988. A community effect in animal development. *Nature*, 336(6201):772-774.
- Habenhauer, G, Feyertag, J, and Dunky, A. 2003. Knorpelstoffwechsel: Cartilage Oligomeric Protein (COMP) als "Prognostikum" der Gelenkknorpel-Destruktion. *J Miner Stoffwechs*, 10:17-21.
- Hagg R, Bruckner P, Hedbom E. 1998. Cartilage fibrils of mammals are biochemically heterogeneous: differential distribution of decorin and collagen IX. *J Cell Biol*, 142(1):285-294.
- Halasz K, Kassner A, Morgelin M, Heinegard D. 2007. COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem*, 282(43):31166-31173.
- Handley CJ, Winter GM, Ilic MZ, Ross JM, Anthony PC, Clem RH. 2002. Distribution of newly synthesized aggrecan in explant cultures of bovine cartilage treated with retinoic acid. *Matrix Biol*, 21(7):579-592.

- Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M. 1998. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics*, 21(7):751-756.
- Hardingham T, Fosang A, Dudhia J. 1992. Aggrecan, the chondroitin/ keratin sulfate proteoglycan from cartilage. In: Kuettner KE, Peyron J, Schleyerbach R, Hascall V, Hrsg. *Articular cartilage and osteoarthritis*. New York: Raven Press, 5-20.
- Hart DJ, Doyle DV, Spector TD. 1999. Incidence and risk factors for radiographic knee osteoarthritis in middle-aged women: the Chingford Study. *Arthritis Rheum*, 42(1):17-24.
- Hascall VC, Handley CJ, McQuillan DJ, Hascall GK, Robinson HC, Lowther DA. 1983. The effect of serum on biosynthesis of proteoglycans by bovine articular cartilage in culture. *Arch Biochem Biophys*, 224(1):206-223.
- Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. 1998a. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 41(9):1632-1638.
- Hashimoto S, Ochs RL, Rosen F, Quach J, McCabe G, Solan J, Seegmiller JE, Terkeltaub R, Lotz M. 1998b. Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6):3094-3099.
- Hawker JR, Jr. 2003. Chemiluminescence-based BrdU ELISA to measure DNA synthesis. *J Immunol Methods*, 274(1-2):77-82.
- Hayes AJ, MacPherson S, Morrison H, Dowthwaite G, Archer CW. 2001. The development of articular cartilage: evidence for an appositional growth mechanism. *Anat Embryol (Berl)*, 203(6):469-479.
- Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, Sommarin Y, Wendel M, Oldberg A, Heinegard D. 1992. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J Biol Chem*, 267(9):6132-6136.
- Helenius G, Backdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B. 2006. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A*, 76(2):431-438.
- Heßler N. 2007. Bakterielle Nanocellulose: Struktur- und Formdesign während der Biosynthese [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Heßler N, Klemm D. 2009. Alteration of bacterial nanocellulose structure by in situ modification using polyethylene glycol and carbohydrate additives. *Cellulose*, 16(5):899-910.



- Hestrin S, Schramm M. 1954. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem J*, 58(2):345-352.
- Hidaka C, Cheng C, Alexandre D, Bhargava M, Torzilli PA. 2006. Maturation differences in superficial and deep zone articular chondrocytes. *Cell Tissue Res*, 323(1):127-135.
- Hiraoka K, Grogan S, Olee T, Lotz M. 2006. Mesenchymal progenitor cells in adult human articular cartilage. *Biorheology*, 43(3-4):447-454.
- Hoenich N. 2006. Cellulose for medical applications: past, present und future. *BioResources*, 1(2):270-280.
- Hu DN, Yang PY, Ku MC, Chu CH, Lim AY, Hwang MH. 2002. Isolation and cultivation of human articular chondrocytes. *Kaohsiung J Med Sci*, 18(3):113-120.
- Huang Q, Hutmacher DW, Lee EH. 2002. In vivo mesenchymal cell recruitment by a scaffold loaded with transforming growth factor beta 1 and the potential for in situ chondrogenesis. *Tissue Eng*, 8(3):469-482.
- Hui W, Rowan AD, Cawston T. 2001. Modulation of the expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases by TGF-beta1 and IGF-1 in primary human articular and bovine nasal chondrocytes stimulated with TNF-alpha. *Cytokine*, 16(1):31-35.
- Hunter CJ, Levenston ME. 2004. Maturation and integration of tissue-engineered cartilages within an in vitro defect repair model. *Tissue Eng*, 10(5-6):736-746.
- Hunter DJ, Li J, LaValley M, Bauer DC, Nevitt M, DeGroot J, Poole R, Eyre D, Guermazi A, Gale D, Felson DT. 2007. Cartilage markers and their association with cartilage loss on magnetic resonance imaging in knee osteoarthritis: the Boston Osteoarthritis Knee Study. *Arthritis Res Ther*, 9(5):R108-
- Hunziker EB, Kapfinger E, Geiss J. 2007. The structural architecture of adult mammalian articular cartilage evolves by a synchronized process of tissue resorption and neoformation during postnatal development. *Osteoarthritis Cartilage*, 15(4):403-413.
- Hunziker EB, Rosenberg LC. 1996. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am*, 78(5):721-733.
- Hutchens SA, Benson RS, Evans BR, O'Neill HM, Rawn CJ. 2006. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. *Biomaterials*, 27(26):4661-4670.
- Iwai R, Fujiwara M, Wakitani S, Takagi M. 2011. Ex vivo cartilage defect model for the evaluation of cartilage regeneration using mesenchymal stem cells. *J Biosci Bioeng*, 111(3):357-364.

- Jahng, J. S., Lee, J. W., Han, C. D., Kim, S. J., and Yoo, N. C. 1997. Comparison of the responsiveness of normal and osteoarthritic human articular chondrocytes in vitro to transforming growth factor-beta(1). *J Bone Miner Res*, 12:F281-F281.
- Jansson V, Muller PE, Thal S, Arnholz C, Milz S, Koch KU, Refior HJ. 2000. A new resorbable bone-cartilage replacement transplant. Results of an animal experiment study. *Orthopade*, 29(2):151-157.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. 1998. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*, 238(1):265-272.
- Jones, A. R. and Flannery, C. R. 2007. Bioregulation of lubricin expression by growth factors and cytokines. *Eur Cell Mater*, 13:40-45.
- Jubel A, Andermahr J, Schiffer G, Fischer J, Rehm KE, Stoddart MJ, Hauselmann HJ. 2008. Transplantation of de novo scaffold-free cartilage implants into sheep knee chondral defects. *Am J Sports Med*, 36(8):1555-1564.
- Kaps C, Fuchs S, Endres M, Vetterlein S, Krenn V, Perka C, Sittinger M. 2004. Molecular characterization of tissue-engineered articular chondrocyte transplants based on resorbable polymer fleece. *Orthopade*, 33(1):76-85.
- Keene DR, Engvall E, Glanville RW. 1988. Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *J Cell Biol*, 107(5):1995-2006.
- KELLGREN JH, LAWRENCE JS. 1957. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis*, 16(4):494-502.
- Kempson GE, Muir H, Pollard C, Tuke M. 1973. The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochim Biophys Acta*, 297(2):456-472.
- Khalafi A, Schmid TM, Neu C, Reddi AH. 2007. Increased accumulation of superficial zone protein (SZP) in articular cartilage in response to bone morphogenetic protein-7 and growth factors. *J Orthop Res*, 25(3):293-303.
- Khan, I. M., Gilbert, S. J., Singhrao, S. K., Duance, V. C., and Archer, C. W. 2008. Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. *Eur Cell Mater*, 16:26-39.
- Kielty CM, Kwan AP, Holmes DF, Schor SL, Grant ME. 1985. Type X collagen, a product of hypertrophic chondrocytes. *Biochem J*, 227(2):545-554.
- Kikuchi K, Hartl CW, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M. 1992. Direct demonstration of transcriptional activation of collagen gene expression in systemic sclerosis

- fibroblasts: insensitivity to TGF beta 1 stimulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 187(1):45-50.
- Kim HK, Moran ME, Salter RB. 1991. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg Am*, 73(9):1301-1315.
- Kirsch T, von der Mark K. 1991. Ca<sup>2+</sup> binding properties of type X collagen. *FEBS Lett*, 294(1-2):149-152.
- Kisiday JD, Kurz B, DiMicco MA, Grodzinsky AJ. 2005. Evaluation of medium supplemented with insulin-transferrin-selenium for culture of primary bovine calf chondrocytes in three-dimensional hydrogel scaffolds. *Tissue Eng*, 11(1-2):141-151.
- Kleemann RU, Krockner D, Cedraro A, Tuischer J, Duda GN. 2005. Altered cartilage mechanics and histology in knee osteoarthritis: relation to clinical assessment (ICRS Grade). *Osteoarthritis Cartilage*, 13(11):958-963.
- Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. 2005. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44(22):3358-3393.
- Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S. 2001. Bacterial synthesized cellulose - artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci*, 26(9):1561-1603.
- Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grontvedt T, Isaksen V, Ludvigsen TC, Roberts S, Solheim E, Strand T, Johansen O. 2007. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am*, 89(10):2105-2112.
- Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, Grontvedt T, Solheim E, Strand T, Roberts S, Isaksen V, Johansen O. 2004. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am*, 86-A(3):455-464.
- König A, Kirschner S. 2003. Long-term results in total knee arthroplasty. *Orthopade*, 32(6):516-526.
- Koyama N, Koshikawa T, Morisaki N, Saito Y, Yoshida S. 1990. Bifunctional Effects of Transforming Growth-Factor-Beta on Migration of Cultured Rat Aortic Smooth-Muscle Cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 169(2):725-729.
- Kozaci LD, Buttle DJ, Hollander AP. 1997. Degradation of type II collagen, but not proteoglycan, correlates with matrix metalloproteinase activity in cartilage explant cultures. *Arthritis Rheum*, 40(1):164-174.
- Kramer F. 2008. Bakterielle Nanocellulose und Nanocellulosekomposite für die Entwicklung geformter Biomaterialien [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

- Kreuz PC, Erggelet C, Steinwachs MR, Krause SJ, Lahm A, Niemeyer P, Ghanem N, Uhl M, Sudkamp N. 2006. Is microfracture of chondral defects in the knee associated with different results in patients aged 40 years or younger? *Arthroscopy*, 22(11):1180-1186.
- Kreuz PC, Muller S, Ossendorf C, Kaps C, Erggelet C. 2009. Treatment of focal degenerative cartilage defects with polymer-based autologous chondrocyte grafts: four-year clinical results. *Arthritis Res Ther*, 11(2):R33-
- Kruckhans, A. R. and Dustmann, H. O. 2004. Indications, methods, and results of cemented, hybrid, and cement-free implantation of THR. *Surg Technol Int*, 12:253-257.
- LaPrade RF, Bursch LS, Olson EJ, Havlas V, Carlson CS. 2008. Histologic and immunohistochemical characteristics of failed articular cartilage resurfacing procedures for osteochondritis of the knee: a case series. *Am J Sports Med*, 36(2):360-368.
- Larsson T, Aspden RM, Heinegard D. 1991. Effects of Mechanical Load on Cartilage Matrix Biosynthesis Invitro. *Matrix*, 11(6):388-394.
- Lee GM, Loeser RF. 1999. Cell surface receptors transmit sufficient force to bend collagen fibrils. *Exp Cell Res*, 248(1):294-305.
- Lee JD, Hwang O, Kim SW, Han S. 1997. Primary cultured chondrocytes of different origins respond differently to bFGF and TGF-beta. *Life Sci*, 61(3):293-299.
- Lohmander LS, Ionescu M, Jugessur H, Poole AR. 1999. Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 42(3):534-544.
- Luyten FP, Hascall VC, Nissley SP, Morales TI, Reddi AH. 1988. Insulin-like growth factors maintain steady-state metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys*, 267(2):416-425.
- Lyman J, Kelley SS, Lee G. 2000. Chondrocyte process extension and migration response to partial thickness cartilage injuries in human explants [Poster]. Orlando, Florida: 46th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society.
- Ma PX, Choi JW. 2001. Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng*, 7(1):23-33.
- Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. 1998. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*, 4(4):415-428.
- Madry H, Zurakowski D, Trippel SB. 2001. Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *Gene Ther*, 8(19):1443-1449.

- Maetzel A, Makela M, Hawker G, Bombardier C. 1997. Osteoarthritis of the hip and knee and mechanical occupational exposure--a systematic overview of the evidence. *J Rheumatol*, 24(8):1599-1607.
- Malda J, van Blitterswijk CA, Grojec M, Martens DE, Tramper J, Riesle J. 2003. Expansion of bovine chondrocytes on microcarriers enhances redifferentiation. *Tissue Eng*, 9(5):939-948.
- Mandl EW, van der Veen SW, Verhaar JA, van Osch GJ. 2002. Serum-free medium supplemented with high-concentration FGF2 for cell expansion culture of human ear chondrocytes promotes redifferentiation capacity. *Tissue Eng*, 8(4):573-580.
- Maniwa S, Ochi M, Motomura T, Nishikori T, Chen J, Naora H. 2001. Effects of hyaluronic acid and basic fibroblast growth factor on motility of chondrocytes and synovial cells in culture. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 72(3):299-303.
- Mankin HJ. 1974. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (first of two parts). *N Engl J Med*, 291(24):1285-1292.
- Mankin HJ. 1982. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am*, 64(3):460-466.
- Manninen P, Riihimäki H, Heliovaara M, Makela P. 1996. Overweight, gender and knee osteoarthritis. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 20(6):595-597.
- Maroudas A, Bayliss MT, Uchitel-Kaushansky N, Schneiderman R, Gilav E. 1998. Aggrecan turnover in human articular cartilage: use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age. *Arch Biochem Biophys*, 350(1):61-71.
- Martin I, Vunjak-Novakovic G, Yang J, Langer R, Freed LE. 1999. Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue. *Exp Cell Res*, 253(2):681-688.
- Martinek V. 2003. Anatomy and pathophysiology of articular cartilage. *Deutsche Zeit Sportmed*, 54(6):166-170.
- Matsuda C, Takagi M, Hattori T, Wakitani S, Yoshida T. 2005. Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Chondrocytes for Construction of Three-dimensional Cartilage Tissue. *Cytotechnology*, 47(1-3):11-17.
- Matyas JR, Atley L, Ionescu M, Eyre DR, Poole AR. 2004. Analysis of cartilage biomarkers in the early phases of canine experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 50(2):543-552.

- McCartney-Francis N, Mizel D, Wong H, Wahl L, Wahl S. 1990. TGF-beta regulates production of growth factors and TGF-beta by human peripheral blood monocytes. *Growth Factors*, 4(1):27-35.
- Minas, T. 2001. Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. *Clin Orthop*, 391:S349-S361.
- Mink JH, Deutsch AL. 1989. Occult cartilage and bone injuries of the knee: detection, classification, and assessment with MR imaging. *Radiology*, 170(3 Pt 1):823-829.
- Miosge N, Hartmann M, Maelicke C, Herken R. 2004. Expression of collagen type I and type II in consecutive stages of human osteoarthritis. *Histochem Cell Biol*, 122(3):229-236.
- Miot S, Woodfield T, Daniels AU, Suetterlin R, Peterschmitt I, Heberer M, van Blitterswijk CA, Riesle J, Martin I. 2005. Effects of scaffold composition and architecture on human nasal chondrocyte redifferentiation and cartilaginous matrix deposition. *Biomaterials*, 26(15):2479-2489.
- Mishima Y, Lotz M. 2008. Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 26(10):1407-1412.
- Mitchell N, Lee ER, Shepard N. 1992. The clones of osteoarthritic cartilage. *J Bone Joint Surg Br*, 74(1):33-38.
- Mitchell N, Shepard N. 1976. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg Am*, 58(2):230-233.
- Mollenhauer J, Aurich M. 2003. Grundlegendes zum Gelenkknorpel. In: Fritz J, Aicher WK, Eichhorn HJ, Hrsg. *Praxisleitfaden der Knorpelreparatur*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 3-10.
- Morales TI. 2007. Chondrocyte moves: clever strategies? *Osteoarthritis Cartilage*, 15(8):861-871.
- Morales TI, Joyce ME, Sobel ME, Danielpour D, Roberts AB. 1991. Transforming growth factor-beta in calf articular cartilage organ cultures: synthesis and distribution. *Arch Biochem Biophys*, 288(2):397-405.
- Morales TI, Roberts AB. 1988. Transforming growth factor beta regulates the metabolism of proteoglycans in bovine cartilage organ cultures. *J Biol Chem*, 263(26):12828-12831.
- Moreira S, Silva NB, Almeida-Lima J, Rocha HA, Medeiros SR, Alves C, Jr., Gama FM. 2009. BC nanofibres: in vitro study of genotoxicity and cell proliferation. *Toxicol Lett*, 189(3):235-241.

- Muir D, Varon S, Manthorpe M. 1990. An enzyme-linked immunosorbent assay for bromodeoxyuridine incorporation using fixed microcultures. *Anal Biochem*, 185(2):377-382.
- Munirah S, Samsudin OC, Chen HC, Salmah SH, Aminuddin BS, Ruszymah BH. 2007. Articular cartilage restoration in load-bearing osteochondral defects by implantation of autologous chondrocyte-fibrin constructs: an experimental study in sheep. *J Bone Joint Surg Br*, 89(8):1099-1109.
- Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI. 1991. Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *J Orthop Res*, 9(4):465-476.
- Nehrer S, Domayer S, Dorotka R, Schatz K, Bindreiter U, Kotz R. 2006. Three-year clinical outcome after chondrocyte transplantation using a hyaluronan matrix for cartilage repair. *Eur J Radiol*, 57(1):3-8.
- Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, DiCesare PE, Michel BA, Hauselmann HJ. 1997. Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Br J Rheumatol*, 36(11):1151-1160.
- Nelson F, Dahlberg L, Laverty S, Reiner A, Pidoux I, Ionescu M, Fraser GL, Brooks E, Tanzer M, Rosenberg LC, Dieppe P, Poole AR. 1998. Evidence for altered synthesis of type II collagen in patients with osteoarthritis. *J Clin Invest*, 102(12):2115-2125.
- Newman AP. 1998. Articular cartilage repair. *Am J Sports Med*, 26(2):309-324.
- Nixon AJ, Lillich JT, Burton-Wurster N, Lust G, Mohammed HO. 1998. Differentiated cellular function in fetal chondrocytes cultured with insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta. *J Orthop Res*, 16(5):531-541.
- Oakley SP, Lassere MN, Portek I, Szomor Z, Ghosh P, Kirkham BW, Murrell GA, Wulf S, Appleyard RC. 2004. Biomechanical, histologic and macroscopic assessment of articular cartilage in a sheep model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 12(8):667-679.
- Obberghen-Schilling E, Roche NS, Flanders KC, Sporn MB, Roberts AB. 1988. Transforming growth factor beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J Biol Chem*, 263(16):7741-7746.
- Obradovic B, Martin I, Padera RF, Treppo S, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. 2001. Integration of engineered cartilage. *J Orthop Res*, 19(6):1089-1097.
- Osborn KD, Trippel SB, Mankin HJ. 1989. Growth factor stimulation of adult articular cartilage. *J Orthop Res*, 7(1):35-42.
- Ostergaard K, Salter DM. 1998. Immunohistochemistry in the study of normal and osteoarthritic articular cartilage. *Prog Histochem Cytochem*, 33(2):93-165.

- Ozbey O, Sahin Z, Ozenci AM, Acar N, Ustunel I. 2009. The effect of systemic corticosteroid treatment on the immunolocalisation of Notch-1, Delta, CD105 and CD166 in rat articular cartilage. *Acta Histochem*, 112(5):424-4331.
- Pattison MA, Wurster S, Webster TJ, Haberstroh KM. 2005. Three-dimensional, nano-structured PLGA scaffolds for bladder tissue replacement applications. *Biomaterials*, 26(15):2491-2500.
- Pei M, Seidel J, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. 2002. Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun*, 294(1):149-154.
- Peterson, L., Minas, T., Brittberg, M., and Lindahl, A. 2003. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation - Results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am*, 85A:17-24.
- Peterson, L., Minas, T., Brittberg, M., Nilsson, A., Sjogren-Jansson, E., and Lindahl, A. 2000. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res*, 374:212-234.
- Petersson IF, Boegard T, Svensson B, Heinegard D, Saxne T. 1998. Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early osteoarthritis of the knee joint. *Br J Rheumatol*, 37(1):46-50.
- Pfeilschifter J, Wolf O, Naumann A, Minne HW, Mundy GR, Ziegler R. 1990. Chemotactic Response of Osteoblast-Like Cells to Transforming Growth-Factor-Beta. *J Bone Miner Res*, 5(8):825-830.
- Poole AR, Ionescu M, Swan A, Dieppe PA. 1994. Changes in cartilage metabolism in arthritis are reflected by altered serum and synovial fluid levels of the cartilage proteoglycan aggrecan. Implications for pathogenesis. *J Clin Invest*, 94(1):25-33.
- Poole, A. R., Kojima, T., Yasuda, T., Mwale, F., Kobayashi, M., and Lavery, S. 2001. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res*, 391:26-33.
- Poole, C. A., Ayad, S., and Gilbert, R. T. 1992. Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *J Cell Sci*, 103 ( Pt 4):1101-1110.
- Postlethwaite AE, Kesioja J, Moses HL, Kang AH. 1987. Stimulation of the Chemotactic Migration of Human-Fibroblasts by Transforming Growth-Factor-Beta. *J Exp Med*, 165(1):251-256.



- Pratta MA, Yao WQ, Decicco C, Tortorella MD, Liu RQ, Copeland RA, Magolda R, Newton RC, Trzaskos JM, Arner EC. 2003. Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J Biol Chem*, 278(46):45539-45545.
- Pretzel D, Linss S, Rochler S, Endres M, Kaps C, Alsalameh S, Kinne RW. 2011. Relative percentage and zonal distribution of mesenchymal progenitor cells in human osteoarthritic and normal cartilage. *Arthritis Res Ther*, 13(2):R64-
- Pretzel D, Pohlers D, Weinert S, Kinne RW. 2009. In vitro model for the analysis of synovial fibroblast-mediated degradation of intact cartilage. *Arthritis Res Ther*, 11(1):R25-
- Qiu W, Murray MM, Shortkroff S, Lee CR, Martin SD, Spector M. 2000. Outgrowth of chondrocytes from human articular cartilage explants and expression of alpha-smooth muscle actin. *Wound Repair Regen*, 8(5):383-391.
- Qureshi HY, Sylvester J, El Mabrouk M, Zafarullah M. 2005. TGF-beta-induced expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene in chondrocytes is mediated by extracellular signal-regulated kinase pathway and Sp1 transcription factor. *J Cell Physiol*, 203(2):345-352.
- Redini F, Galera P, Mauviel A, Loyau G, Pujol JP. 1988. Transforming growth factor beta stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes. *FEBS Lett*, 234(1):172-176.
- Rizkalla G, Reiner A, Bogoch E, Poole AR. 1992. Studies of the articular cartilage proteoglycan aggrecan in health and osteoarthritis. Evidence for molecular heterogeneity and extensive molecular changes in disease. *J Clin Invest*, 90(6):2268-2277.
- Roos H, Lauren M, Adalberth T, Roos EM, Jonsson K, Lohmander LS. 1998. Knee osteoarthritis after meniscectomy: prevalence of radiographic changes after twenty-one years, compared with matched controls. *Arthritis Rheum*, 41(4):687-693.
- Ruediger T, Dunzel, A, Pretzel, D, Föhr, P, Burgkart, R, Klemm, D, Ahrem, H, Kinne, R. 2011. Bacterial Nanocellulose as an innovative Polymer for Cartilage Engineering [Poster]. Jena : European Symposium on Biomaterials and Related Areas.
- Sah RL, Chen AC, Grodzinsky AJ, Trippel SB. 1994. Differential effects of bFGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants. *Arch Biochem Biophys*, 308(1):137-147.
- Sah RL, Trippel SB, Grodzinsky AJ. 1996. Differential effects of serum, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor-2 on the maintenance of cartilage physical properties during long-term culture. *J Orthop Res*, 14(1):44-52.
- Salminen H, Perala M, Lorenzo P, Saxne T, Heinegard D, Saamanen AM, Vuorio E. 2000. Up-regulation of cartilage oligomeric matrix protein at the onset of articular cartilage

- degeneration in a transgenic mouse model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 43(8):1742-1748.
- Schmidt TA, Gastelum NS, Han EH, Nugent-Derfus GE, Schumacher BL, Sah RL. 2008. Differential regulation of proteoglycan 4 metabolism in cartilage by IL-1 alpha, IGF-1, and TGF-beta 1. *Osteoarthritis Cartilage*, 16(1):90-97.
- Schmitz JP, Dean DD, Schwartz Z, Cochran DL, Grant GM, Klebe RJ, Nakaya H, Boyan BD. 1996. Chondrocyte cultures express matrix metalloproteinase mRNA and immunoreactive protein; stromelysin-1 and 72 kDa gelatinase are localized in extracellular matrix vesicles. *J Cell Biochem*, 61(3):375-391.
- Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J. 2002. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*, 10(1):62-70.
- Secretan C, Bagnall KM, Jomha NM. 2010. Effects of introducing cultured human chondrocytes into a human articular cartilage explant model. *Cell Tissue Res*, 339(2):421-427.
- Shakibaei M, Csaki C, Rahmanzadeh M, Putz R. 2008. Interaction between human chondrocytes and extracellular matrix in vitro. A contribution to autologous chondrocyte transplantation. *Orthopade*, 37(5):440-447.
- Shakibaei M, Merker HJ. 1999. beta 1-integrins in the cartilage matrix. *Cell Tissue Res*, 296(3):565-573.
- Shimizu M, Minakuchi K, Kaji S, Koga J. 1997. Chondrocyte migration to fibronectin, type I collagen, and type II collagen. *Cell Struct Funct*, 22(3):309-315.
- Simon S, Radin E. 2001. Biomechanics of Joints. In: Ruddy S, Harris JED, Sledge CB, Budd RC, Sargent JS, Hrsg. *Kelly's Textbook of Rheumatology*. 6. Auflage. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 73-78.
- Sledge SL. 2001. Microfracture techniques in the treatment of osteochondral injuries. *Clin Sports Med*, 20(2):365-377.
- Smith RK, Zunino L, Webbon PM, Heinegard D. 1997. The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load. *Matrix Biol*, 16(5):255-271.
- Spahn, G. 2006. Knorpelschaden und Gonarthrose. Teil I: Physiologie und Pathophysiologie des Knorpels und der Gonarthrose. *Akt Traumatol*, 36:1-13.
- Squires GR, Okouneff S, Ionescu M, Poole AR. 2003. The pathobiology of focal lesion development in aging human articular cartilage and molecular matrix changes characteristic of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 48(5):1261-1270.

- Stark Y, Suck K, Kasper C, Wieland M, van Griensven M, Scheper T. 2006. Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering. *Exp Toxicol Pathol*, 57(4):305-311.
- Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Noth U. 2007. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther*, 9(3):213-227.
- Steinwachs, M. R., Guggi, T. H., and Kreuz, P. C. 2008. Marrow stimulation techniques. *Injury*, 39:S26-S31.
- Stockwell, R. A. 1978. Chondrocytes. *J Clin Pathol Suppl*, 12:7-13.
- Stockwell R. 1979. *Biology of cartilage cells*. Cambridge: Cambridge University Press, 32-80.
- Su S, DiBattista JA, Sun Y, Li WQ, Zafarullah M. 1998. Up-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by TGF-beta in articular chondrocytes is mediated by serine/threonine and tyrosine kinases. *J Cell Biochem*, 70(4):517-527.
- Suardet L, Gaide AC, Calmes JM, Sordat B, Givel JC, Eliason JF, Odartchenko N. 1992. Responsiveness of three newly established human colorectal cancer cell lines to transforming growth factors beta 1 and beta 2. *Cancer Res*, 52(13):3705-3712.
- Suh JK, Baek GH, Aroen A, Malin CM, Niyibizi C, Evans CH, Westerhausen-Larson A. 1999. Intermittent sub-ambient interstitial hydrostatic pressure as a potential mechanical stimulator for chondrocyte metabolism. *Osteoarthritis Cartilage*, 7(1):71-80.
- Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, Gatenholm P. 2005. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials*, 26(4):419-431.
- Takebayashi T, Iwamoto M, Jikko A, Matsumura T, Enomotoiwamoto M, Myoukai F, Koyama E, Yamaai T, Matsumoto K, Nakamura T, Kurisu K, Noji S. 1995. Hepatocyte Growth-Factor Scatter Factor Modulates Cell Motility, Proliferation, and Proteoglycan Synthesis of Chondrocytes. *J Cell Biol*, 129(5):1411-1419.
- Tallheden T, Karlsson C, Brunner A, Van Der LJ, Hagg R, Tommasini R, Lindahl A. 2004. Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 12(7):525-535.
- Temenoff JS, Mikos AG. 2000. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*, 21(5):431-440.

- Theodoropoulos, J. S., De Croos, J. N., Park, S. S., Pilliar, R., and Kandel, R. A. 15-3-2011. Integration of Tissue-engineered Cartilage With Host Cartilage: An In Vitro Model. Clin Orthop Relat Res, PMID:21403985-
- Trippel, S. B. 1995. Growth-Factor Actions on Articular-Cartilage. J Rheumatol, 22:129-132.
- Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ, Danielson KG, Hall DJ, Tuan RS. 2003. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. J Biol Chem, 278(42):41227-41236.
- van der Kraan PM, Buma P, van Kuppevelt T, van den Berg WB. 2002. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. Osteoarthritis Cartilage, 10(8):631-637.
- van der Kraan PM, Vitters E, van den BW. 1992a. Differential effect of transforming growth factor beta on freshly isolated and cultured articular chondrocytes. J Rheumatol, 19(1):140-145.
- van der Kraan PM, Vitters EL, van den Berg WB. 1992b. Inhibition of proteoglycan synthesis by transforming growth factor beta in anatomically intact articular cartilage of murine patellae. Ann Rheum Dis, 51(5):643-647.
- van Osch GJ, van den Berg WB, Hunziker EB, Hauselmann HJ. 1998a. Differential effects of IGF-1 and TGF beta-2 on the assembly of proteoglycans in pericellular and territorial matrix by cultured bovine articular chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage, 6(3):187-195.
- van Osch GJ, van der Veen SW, Buma P, Verwoerd-Verhoef HL. 1998b. Effect of transforming growth factor-beta on proteoglycan synthesis by chondrocytes in relation to differentiation stage and the presence of pericellular matrix. Matrix Biol, 17(6):413-424.
- van Susante JL, Buma P, van Beuningen HM, van den Berg WB, Veth RP. 2000. Responsiveness of bovine chondrocytes to growth factors in medium with different serum concentrations. J Orthop Res, 18(1):68-77.
- Velikonja NK, Wozniak G, Malicev E, Knezevic M, Jeras M. 2001. Protein synthesis of human articular chondrocytes cultured in vitro for autologous transplantation. Pflugers Arch, 442(6 Suppl 1):R169-R170.
- Venn MF. 1979. Chemical composition of human femoral and head cartilage: influence of topographical position and fibrillation. Ann Rheum Dis, 38(1):57-62.
- Verdier MP, Seite S, Guntzer K, Pujol JP, Boumediene K. 2005. Immunohistochemical analysis of transforming growth factor beta isoforms and their receptors in human

- cartilage from normal and osteoarthritic femoral heads. *Rheumatol Int*, 25(2):118-124.
- Verschure PJ, Joosten LA, van der Kraan PM, van den Berg WB. 1994. Responsiveness of articular cartilage from normal and inflamed mouse knee joints to various growth factors. *Ann Rheum Dis*, 53(7):455-460.
- Villiger PM, Lotz M. 1992. Differential expression of TGF beta isoforms by human articular chondrocytes in response to growth factors. *J Cell Physiol*, 151(2):318-325.
- Vinardell T, Thorpe SD, Buckley CT, Kelly DJ. 2009. Chondrogenesis and integration of mesenchymal stem cells within an in vitro cartilage defect repair model. *Ann Biomed Eng*, 37(12):2556-2565.
- Vivien D, Galera P, Loyau G, Pujol JP. 1991. Differential response of cultured rabbit articular chondrocytes (RAC) to transforming growth factor beta (TGF-beta)-evidence for a role of serum factors. *Eur J Cell Biol*, 54(2):217-223.
- Voigt H, Lemke AK, Mentlein R, Schunke M, Kurz B. 2009. Tumor necrosis factor alpha-dependent aggrecan cleavage and release of glycosaminoglycans in the meniscus is mediated by nitrous oxide-independent aggrecanase activity in vitro. *Arthritis Res Ther*, 11(5):R141-
- von der Mark K, Kirsch T, Nerlich A, Kuss A, Weseloh G, Gluckert K, Stoss H. 1992. Type X collagen synthesis in human osteoarthritic cartilage. Indication of chondrocyte hypertrophy. *Arthritis Rheum*, 35(7):806-811.
- Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Bursac PM, Langer R, Freed LE. 1998. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Prog*, 14(2):193-202.
- Wagner S, Hofstetter W, Chiquet M, Mainil-Varlet P, Stauffer E, Ganz R, Siebenrock KA. 2003. Early osteoarthritic changes of human femoral head cartilage subsequent to femoro-acetabular impingement. *Osteoarthritis Cartilage*, 11(7):508-518.
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. 1994. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 76(4):579-592.
- Wann AK, Mistry J, Blain EJ, Michael-Titus AT, Knight MM. 2010. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid reduce interleukin-1beta-mediated cartilage degradation. *Arthritis Res Ther*, 12(6):R207-
- Waters K. 2007. Applications of high-frequency ultrasound to diagnostic and regenerative medicine. In: Chen C, Hrsg. *Ultrasonic and advanced methods for nondestructive testing and material characterization*. Singapur: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 169-194.

- Werb Z. 1997. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*, 91(4):439-442.
- Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. 2003. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res*, 412:196-212.
- Williamson AK, Masuda K, Thonar EJ, Sah RL. 2003. Growth of immature articular cartilage in vitro: correlated variation in tensile biomechanical and collagen network properties. *Tissue Eng*, 9(4):625-634.
- Winnemoller M, Schmidt G, Kresse H. 1991. Influence of decorin on fibroblast adhesion to fibronectin. *Eur J Cell Biol*, 54(1):10-17.
- Winter GM, Poole CA, Ilic MZ, Ross JM, Robinson HC, Handley CJ. 1998. Identification of distinct metabolic pools of aggrecan and their relationship to type VI collagen in the chondrons of mature bovine articular cartilage explants. *Connect Tissue Res*, 37(3-4):277-293.
- Wojtys E, Wilson M, Buckwalter K, Braunstein E, Martel W. 1987. Magnetic resonance imaging of knee hyaline cartilage and intraarticular pathology. *Am J Sports Med*, 15(5):455-463.
- Wolf K, Mazo I, Leung H, Engelke K, von Andrian UH, Deryugina EI, Strongin AY, Brocker EB, Friedl P. 2003. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol*, 160(2):267-277.
- Wong M, Wuethrich P, Eggli P, Hunziker E. 1996. Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography. *J Orthop Res*, 14(3):424-432.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, 370(6488):341-347.
- Wu JJ, Woods PE, Eyre DR. 1992. Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J Biol Chem*, 267(32):23007-23014.
- Wu W, Billingham RC, Pidoux I, Antoniou J, Zukor D, Tanzer M, Poole AR. 2002. Sites of collagenase cleavage and denaturation of type II collagen in aging and osteoarthritic articular cartilage and their relationship to the distribution of matrix metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 13. *Arthritis Rheum*, 46(8):2087-2094.

- Yebra M, Parry GC, Stromblad S, Mackman N, Rosenberg S, Mueller BM, Cheresh DA. 1996. Requirement of receptor-bound urokinase-type plasminogen activator for integrin  $\alpha$ v $\beta$ 5-directed cell migration. *J Biol Chem*, 271(46):29393-29399.
- Yokoyama M, Miwa H, Maeda S, Wakitani S, Takagi M. 2008. Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion. *J Biosci Bioeng*, 106(1):46-50.
- Zahedmanesh H, Mackle JN, Sellborn A, Drotz K, Bodin A, Gatenholm P, Lally C. 2011. Bacterial cellulose as a potential vascular graft: Mechanical characterization and constitutive model development. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 97(1):105-113.
- Zaia J, Boynton RE, McIntosh A, Marshak DR, Olsson H, Heinegard D, Barry FP. 1997. Post-translational modifications in cartilage oligomeric matrix protein. Characterization of the N-linked oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Biol Chem*, 272(22):14120-14126.
- Zhang E, Li X, Zhang S, Chen L, Zheng X. 2005. Cell cycle synchronization of embryonic stem cells: effect of serum deprivation on the differentiation of embryonic bodies in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 333(4):1171-1177.
- Zhou Q, Gong Y, Gao C. 2005. Microstructure and mechanical properties of poly(L-lactide) scaffolds fabricated by gelatin particle leaching method. *J Appl Polym Sci*, 98(3):1373-1379.
- Zimber MP, Tong B, Dunkelman N, Pavelec R, Grande D, New L, Purchio AF. 1995. Tgf-Beta promotes the growth of bovine chondrocytes in monolayer culture and the formation of cartilage tissue on three-dimensional scaffolds. *Tissue Eng*, 1(3):289-300.

**Internetquellen:**

[1] PeproTech Inc., Rocky Hill, USA

URL: <http://www.peprotech.com/content/focusarticles.htm?id=72>.

Zugriffsdatum: 11.12.2010

[2] Gesellschaft Deutscher Chemiker e.V.

URL: <http://www.aktuelle-wochenschau.de/2009/w30/woche30.html>

Zugriffsdatum: 05.08.2011



## ANHANG

**Tab. 3: Klinische und radiologische Daten der humanen Gewebespende für die Chondrozytenisolation.**

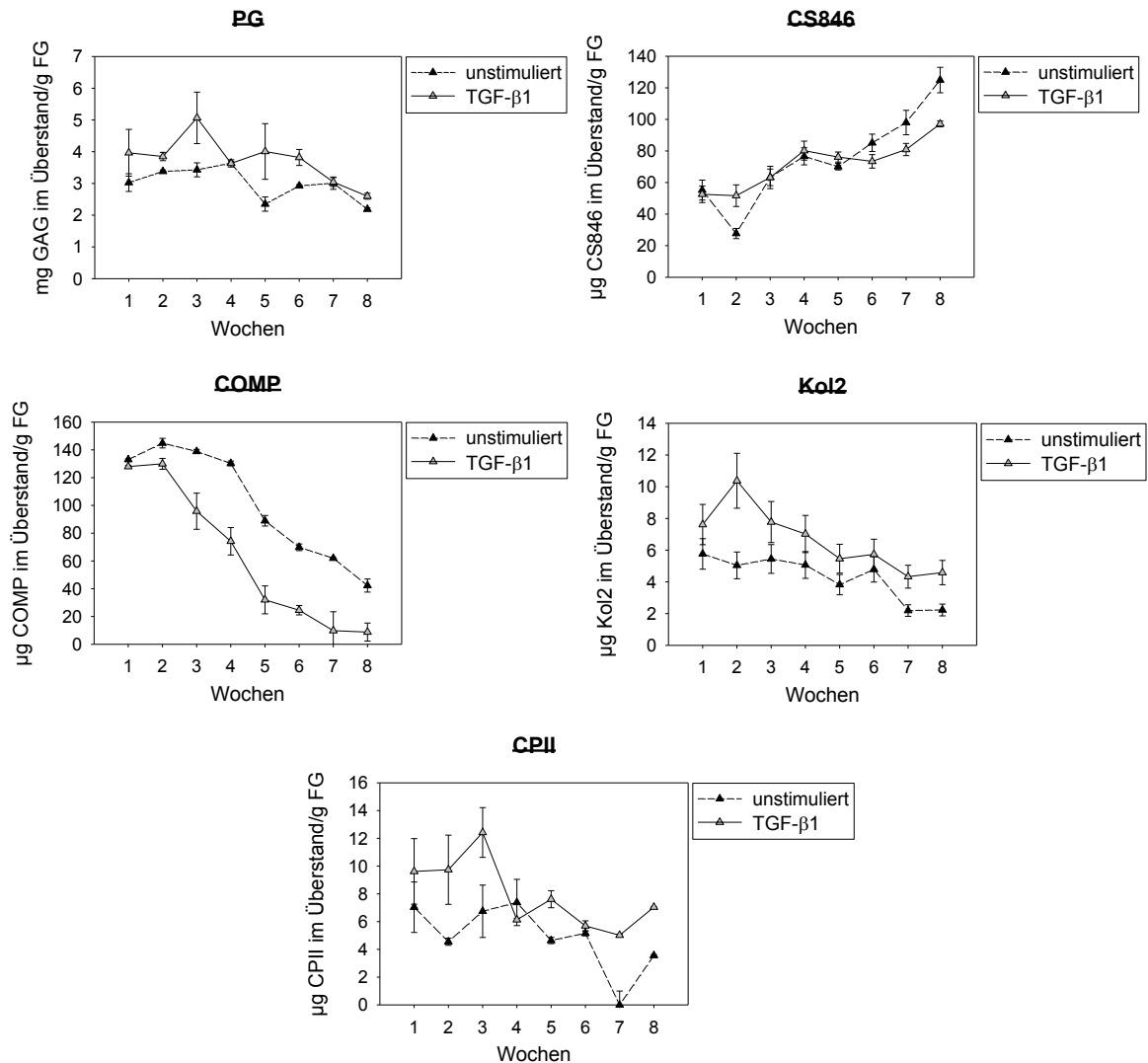
Patienten-ID	Alter	Geschlecht	CRP (mg/l)*	BSG (mm/h)*	ICRS Grading Score*	Kellgren-Lawrence-Skala*	Chondrozyten verwendet für
1	63	w	0.3	9	3A	3	PA, CTA, TGFβRII
2	77	m	2.0	7	3A	3	PA, CTA, TGFβRII
3	67	w	1.2	5	3A	3	PA, CTA, TGFβRII
4	64	w	6.3	9	2B	2	PA, TGFβRII
5	75	w	5.4	19	2A	1	PA, TGFβRII
6	77	w	0.3	6	3A	3	PA, TGFβRII
7	80	m	8.1	23	3A	3	PA
8	59	m	3.0	12	2A	2	PA

Mittleres Patientenalter  $70,25 \pm 2,79$  Jahre; \*zum Zeitpunkt der Operation; m = männlich, w = weiblich; CRP = C-reaktives Protein (normal < 10 mg/l), BSG = Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (normal < 20 mm/h). Die makroskopische Beurteilung des Knorpelschadens erfolgte nach dem anerkannten Klassifikationssystem der ICRS (Brittberg und Winalski 2003), das röntgenologische Grading basiert auf der Kellgren-Lawrence-Skala (KELLGREN und LAWRENCE 1957). PA = Proliferationsassay, CTA = Chemotaxisassay, TGFβRII = FACS-Analyse auf Expression des TGFβRII-Rezeptors.

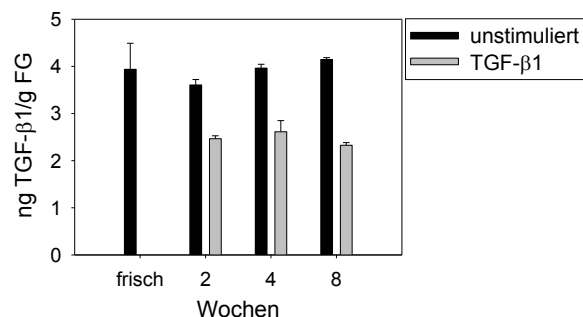
**Tab. 4: Ausführliche Liste der verwendeten Bedingungen und Primersequenzen für die „real-time“-RT-PCR der bovinen Gene.**

Gen	Primer upstream (5'→3')	Primer downstream (3'→5')	Produkt in bp	Annealing-Temperatur	Schmelztemperatur
Aldolase	5'-TCATCCTCTTCCA TGAGACACTCTA-3'	3'-ATTCTGCTGGCA GATACTGGCATAA-5'	314	58°C	88°C
Aggrekan	5'-CAGAGTTTCAGT GGGACAGCA-3'	3'-AGACACCCAGCT CTCCTGAA-5'	189	60°C	84°C
Kol2 (α1-Kette)	5'-CATCTGGTTTGGA GAAACCATC-3'	3'-GCCCAGTTCAGGT CTCTTAG-5'	600	61°C	83°C
Kol1 (α1-Kette)	5'-AGCCAGCAGAT CGAGAACAT-3'	3'-ACACAGGTCTC ACCGGTTTC-5'	185	60°C	86°C

Alle Primer wurden von der Firma MWG synthetisiert. Amplifikationsprotokoll (40 Zyklen): (0) initiale Denaturierung für 2 min bei 95°C; (1) Denaturierung für 15 s bei 95°C, (2) spezifische Primer-Anlagerung für 15 s (Annealing-Temperatur siehe Tab.), (3) Amplifikation bei 68°C für 20 s, (4) zusätzlicher Heizschritt zum Abschmelzen von Primerdimeren bis 5°C unterhalb der Schmelztemperatur des PCR-Produktes (siehe Tab.). Schmelzkurvenprotokoll (1 Zyklus): (5) Denaturierung für 1 s bei 95°C, (6) Kühlung auf 5°C oberhalb der Primer-Annealing-Temperatur für 10 s, (7) Erhitzen auf 95°C (0,1°C/s) für 20 min, (8) finales Abkühlen auf 40°C für 5 min.



**Abb. 46: Wöchentliche Einzelfreisetzungen relevanter Matrixmarker in den Mediumüberstand.** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der wöchentlich freigesetzten Molekülmengen aus dem unstimulierten bzw. TGF- $\beta$ 1-stimulierten Knorpel von Quadruplikaten der wochenweise gepoolten Mediumüberstände.



**Abb. 47: Quantitative Analyse des endogenen TGF- $\beta$ 1-Gehaltes im Knorpel.** Dargestellt ist der Vergleich zwischen frischem und kultiviertem Knorpel mit und ohne TGF- $\beta$ 1-Stimulation zu den verschiedenen Kulturzeitpunkten. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von Duplikaten aus jeweils 4 Proben  $\times$  5 Knorpelzylinder. Man beachte die durchgehende Down-Regulation der knorpel-eigenen TGF- $\beta$ 1-Synthese bei externer Stimulation mit dem Wachstumsfaktor.

## Lebenslauf

Name	Stefanie Linß
Geburt	17.10.1986 in Eisenach
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulische Ausbildung

1993-1997	Staatliche Grundschule Bad Blankenburg
1997-2005	Friedrich-Fröbel-Gymnasium Bad Blankenburg
06/2005	Allgemeine Hochschulreife

### Akademische Ausbildung

10/2005- 05/2012	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2009-03/2010	IZKF-Promotionsstipendium zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses
02/2011-01/2012	Praktisches Jahr:  Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Prof. Dr. med. T. Doenst, Universitätsklinikum Jena  Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Dipl. med. M. Göring, Robert-Koch-Krankenhaus Apolda  Klinik für Kardiologie, Abt. für Rhythmologie und invasive Elektrophysiologie, Prof. Dr. med. J.-C. Geller, Zentralklinik Bad Berka
05/2012	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
21.05.2012	Erteilung der Approbation

Jena, den 31.07.2012

---

Stefanie Linß

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

- Pretzel D, **Linss S**, Rochler S, Endres M, Kaps C, Alsalameh S, Kinne RW. 2011. Relative percentage and zonal distribution of mesenchymal progenitor cells in human osteoarthritic and normal cartilage. *Arthritis Res Ther*, 13(2):R64.
- Ahrem H, Pretzel D, **Linss S**, Kinne RW, Klemm D. 2010. Strukturdesign bakterieller Nanocellulose-Implantate für eine verbesserte Migration von Knorpelzellen [Poster]. Heilbad Heiligenstadt: Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien.
- Pretzel D, **Linss S**, Rochler S, Kinne RW. 2010. Relative percentage and zona distribution of mesenchymal progenitor cells in adult human articular cartilage [Poster]. Barcelona: ICRS-World Congress.

## **Danksagung**

*„Keine Schuld ist dringender als die, Dank zu sagen.“ (Marcus Tullius Cicero)*

Daher möchte ich mich im Folgenden bei all den Personen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht oder durch Ihre Unterstützung zu deren Gelingen beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Raimund W. Kinne für die freundliche Überlassung des Themas, die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, für die stete und engagierte Betreuung dieser Arbeit sowie deren Begutachtung.

Für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft, die hervorragende fachkundige Anleitung sowie für die freundschaftliche Ebene, auf der wir von Beginn an kommunizierten, bin ich Herrn Dr. rer. nat. David Pretzel zu tiefstem Dank verpflichtet. Ich wünsche ihm für seine weitere berufliche und private Laufbahn das Allerbeste.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der AG „Experimentelle Rheumatologie“ für das offene und freundschaftliche Arbeitsklima und die Hilfe bei allen theoretischen oder methodischen Fragestellungen. Stellvertretend sei hier Frau Cordula Müller genannt, die durch ihre sachkundige Hand in allen histologischen Belangen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und die dank ihres heiteren Gemüts stets etwas Sonne in den Laboralltag gezaubert hat.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an Herrn Dipl.-Biol. Hannes Ahrem von der Jenpolymer Materials Ltd. & Co. KG für die stets einwandfreie und zuverlässige Bereitstellung der BNC-Implantate und seine exzellente Unterstützung bei den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Herzlicher Dank gebührt weiterhin Herrn Dr. Christian Kaps, Frau Dr. Michaela Endres und den Mitarbeitern von TransTissueTechnologies Berlin für die komplikationslose Kooperation bezüglich der Chemotaxis- und Differenzierungs-Assays sowie zahlreiche nützliche Ratschläge.

Die Untersuchungen waren nur dank der finanziellen Unterstützung des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) möglich.

Zuletzt danke ich meinem Lebensgefährten Robby Klette für sein Verständnis und seine unermüdliche Geduld und Liebe, mit der er mir in jeder Lebenslage den Rücken stärkt sowie meiner Mutter Karin Linß, die mich mein Leben lang in all meinen Vorhaben vorbehaltlos unterstützt hat.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Raimund W. Kinne, Dr. rer. nat. David Pretzel, Herr Dipl.-Biol. Hannes Ahrem,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 31.07.2012

---

Stefanie Linß